



Crisanto José Monteiro Brito

Licenciado em Bioquímica

Aplicação de Aminoguanidinas em organocatálise

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Paula Branco, Professora, FCT/UNL

Co-orientadores: Doutora Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor António Jorge Dias Parola
Professor Associado com Agregação, FCT-UNL

Arguentes: Doutor Ricardo Alexandre Ventura das Chagas
Investigador, CENIMAT|i3N, FCT-UNL

Vogais: Professora Doutora Paula Cristina de Sérió Branco
Professora Auxiliar com Agregação, FCT-UNL

Outubro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Crisanto José Monteiro Brito

Licenciado em Bioquímica

**Aplicação de Aminoguanidinas para
organocatálise**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Paula Branco, Professora, FCT/UNL

Co-orientadores: Doutora Ana Lourenço, Professora auxiliar, FCT/UNL

Aplicação de Aminoguanidinas em Organocatálise

Copyright © Crisanto José Monteiro Brito Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à professora Paula Banco. Por toda a ajuda e conhecimento transmitido. O seu apoio foi fundamental, agradeço também pela paciência e atenção ao longo deste projeto. Agradeço de igual forma à professora Ana Lourenço, a sua ajuda e boa disposição foram essenciais.

Quero agradecer à professora Luísa Ferreira que esteve sempre presente e ajudou sempre.

Durante o período estive rodeado de pessoas que me ajudaram, por isso agradeço aos meus colegas dos laboratórios 202 e 205. Um especial agradecimento ao Rafael e ao Henrique, com estes partilhei o laboratório durante um ano, graças a eles tudo se tornou mais fácil. A ajuda do Rafael foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

Em relação ao serviço de RMN os meus agradecimentos para a Doutora Ana Teresa Lopes. O meu agradecimento ao Rodrigo que me ajudou com o HPLC e fez com tudo corresse bem, a sua dedicação foi extraordinária.

Para todos os meus amigos um agradecimento. Sem eles estes anos de faculdade não seriam os mesmos. Ao Arthur, João, Pedro, Tamára e Edgar um grande obrigado. Um agradecimento especial a todos os trabalhadores da Pizzaria La Bella Vita, eles que sempre me apoiaram e de onde saíram grandes amizades que irei levar para a vida.

Por fim, um agradecimento especial a toda a minha família que tornaram isto possível. Dedico este trabalho a minha querida avó Antónia Paula. Aos meus pais, irmãos, primos e tios sei do esforço que fizeram por isso um Obrigado.

Resumo

Catálise é uma área de bastante importância em química orgânica, e o estudo desta disciplina é essencial para o desenvolvimento de uma química mais sustentável e limpa.

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo de aminoguanidinas cíclicas como catalisadores em reações de Adição de Michael, a sua atividade e sua estereoespecificidade. Estas pequenas moléculas orgânicas foram acopladas a nanopartículas metálicas magnéticas (MNPs), suporte que foi testado a sua reprodutibilidade e sua vantagem magnética em Work-ups.

Primeiro sintetizou-se o catalisador que contou com 4 passos principais: começando com a funcionalização das MNPs com uma amina primária, neste caso APTES. Depois seguiu-se a adição de uma prolina protegida. O terceiro passo foi a desproteção para, por fim, ligar uma carbodiimida, obtendo uma aminoguanidina cíclica.

Para o estudo do catalisador usou-se uma reação de adição de Michael onde o produto obtido possui dois centros assimétricos, e através de ^1H NMR e de HPLC em fase estacionária quiral foi possível verificar o excesso enantiomérico e diastereomérico, podendo tirar conclusões em relação à atividade do catalisador desenvolvido.

Abstract

Catalysis is an area of great importance in organic chemistry, and the study of this field is essential for the development of a more sustainable and clean chemical process.

This work had as its focus the study of cyclical aminoguanidines as catalysts for the Michael Addition Reaction, its activity and its stereospecificity. These small organic molecules were coupled with metallic Magnetic Nanoparticles (MNPs), this support was tested for its reproducibility and its magnetic advantage in Work-ups.

First, the catalyst was synthesized in 4 main steps: starting with the functionalisation of the MNPs with a primary amine, in this case APTES. Afterwards, a protected proline was added. The third step was the deprotection and, lastly, connection with a carbodiimide, obtaining a cyclical aminoguanidine.

Michael's Addition Reaction was used to study the catalyst, where the obtained product has two asymmetrical centres and, through ^1H NMR and HPLC in chiral stationary phase it was possible to determine the enantiomeric and diastereomeric excess, conclusions about the developed catalyst's activity were determined.

Abreviaturas

δ	Desvio químico
ν	Número de onda (cm^{-1})
$^1\text{HRMN}$	Ressonância magnética nuclear de próton
AG	Grupo de ancoragem
APST	(3-aminopropil) silanetiol
APTES	(3-aminopropil) trietoxissilano
d	Duplete
DBN	1,5-Diazabicyclo(4.3.0)non-5-ene
DBU	1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene
DCM	Diclorometano
dd	Duplete de dupletos
DCC	1,3-Diciclo-hexilcarbodiimida
dr	Razão Diastereomérica
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
eq	Equivalente molar
FG	Grupos funcionais
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MNP	Nanopartículas magnéticas
ppm	Partes por milhão
NHS	N-hidroxissuccinimida
NP	Nanopartículas
q	Quarteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singuleto
$\text{S}_{\text{N}}2$	Substituição nucleofílica
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada delgada

Conteúdo

AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
ABREVIATURAS	XIII
CONTEÚDO	XV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE TABELA.....	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 GUANIDINAS.....	1
1.2 CATÁLISE ASSIMÉTRICA.....	2
1.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E SUA APLICAÇÃO EM CATÁLISE	5
1.4 ADIÇÃO DE MICHAEL.....	6
2. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	9
2.1 PREÂMBULO	9
2.2 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	9
2.3 INSERÇÃO DA FMOC-PROLINA.....	14
2.4 REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA PROLINA DERIVATIZADA	16
2.5 INTRODUÇÃO DO GRUPO CARBODIIMIDA	16
2.6 VIA ALTERNATIVA À SÍNTESE DO CATALISADOR.....	17
2.7 ADIÇÃO DE MICHAEL ENTRE NITRO-ESTIRENO (10) E 2- OXOCICLOPENTANO-1-CARBOXILATO DE ETILO (11)	18
2.7.1 MECANISMO.....	20
2.7.2 RECUPERAÇÃO E REUTILIZAÇÃO DE CATALISADOR (1).....	20
2.7.3 RESULTADOS ANALÍTICOS	21
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1 PREÂMBULO	27
3.2 SÍNTESE DE CATALISADOR	28

3.2.1 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	28
3.2.2 INSERÇÃO DA FMOC-PROLINA	29
3.2.3 REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA PROLINA DERIVATIZADA.....	30
3.2.4 INTRODUÇÃO DO GRUPO CARBODIIMIDA.....	30
3.3 VIA ALTERNATIVA À SÍNTESE DO CATALISADOR	31
3.3.1 INSERÇÃO DA FMOC-PROLINA	31
3.3.2 REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA PROLINA	31
3.4 TESTE DE AMINAS LIVRES	32
3.5 REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL.....	32
3.5.1 REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL COM CATÁLISE DE DBU	32
3.5.2 REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL COM AUXÍLIO O CATALISADOR 1	33
4. CONCLUSÕES	35
5. BIBLIOGRAFIA.....	37
6. ANEXOS	39

Índice de figuras

FIGURA 1.1: ESTRUTURA GERAL DA GUANIDINA LIVRE E PROTONADA.....	1
FIGURA 1.2: CREATINA E SEU ANÁLOGO	1
FIGURA 1.3: GUANIDINA COM PROPRIEDADES ANTITRANSPIRANTES	2
FIGURA 1.4: EXEMPLO DE UMA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	3
FIGURA 1.5: EXEMPLO DE UMA CATÁLISE HETEROGÊNEA	3
FIGURA 1.6: ESQUEMA DA RELAÇÃO ENTRE POSSÍVEIS ESTEREISÓMEROS (SETAS A VERMELHO INDICAM DIASSTEREÓMEROS E A NEGRITO INDICAM OS VÁRIOS ENANTIÓMEROS FORMADOS).....	4
FIGURA 1.7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MOLÉCULA ANCORADA A UMA NP	5
FIGURA 1.8: NPs DE TITÂNIO E ALUMÍNIO ACOPLADAS A PEQUENAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS.....	6
FIGURA 1.9: ESQUEMA DA REAÇÃO PADRÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL.....	7
FIGURA 2.1: CATALISADOR A DESENVOLVER ENVOLVENDO A FUNCIONALIZAÇÃO DE Fe ₃ O ₄ COM UM DERIVADO DA PROLINA	9
FIGURA 2.2: ESPETRO IV DO NANOPARTÍCULA Fe ₃ O ₄	11
FIGURA 2.3: ESPETRO IV DO PRODUTO 2.....	12
FIGURA 2.4: ESQUEMA DA HIDROLISE DO APTES A APST.....	13
FIGURA 2.5: ESQUEMA DA FUNCIONALIZAÇÃO.....	13
FIGURA 2.6: ESQUEMA DA ATIVAÇÃO DA FMOC-PROLINA.....	14
FIGURA 2.7: MECANISMO DA FORMAÇÃO DO PRODUTO 3.....	14
FIGURA 2.8: MECANISMO PARA A FORMAÇÃO DE 4.....	15
FIGURA 2.9: ESQUEMA DA REAÇÃO DE ADIÇÃO DA FMOC-PROLINA Á NANOPARTÍCULA	15
FIGURA 2.10: MECANISMO DE DESPROTEÇÃO DE 5.....	16
FIGURA 2.11: MECANISMO DE ADIÇÃO DE DCC AO PRODUTO 6	17
FIGURA 2.12: PRODUTOS DA REAÇÃO ADIÇÃO DA FMOC-PROLINA AO APTES.....	18
FIGURA 2.13: ESQUEMA DA REAÇÃO PADRÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL.....	19
FIGURA 2.14: POSSÍVEL ESTADO DE TRANSIÇÃO, O PRIMEIRO PROPOSTO POR YU ET AL, O SEGUNDO PROPOSTO PARA ESTE TRABALHO	20
FIGURA 2.15: PRODUTO DA REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL (12)	21
FIGURA 2.16: ESPETRO DE RMN DO PRODUTO 12.....	22
FIGURA 2.17: ESPETRO DE NMR DO PRODUTO 12 (5.5ppm A 4.75ppm)	23
FIGURA 2.18: HPLC QUIRAL DO PRODUTO 12.....	24

Índice de tabela

TABELA 1: CONDIÇÕES DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	10
TABELA 2: RESULTADO DA ADIÇÃO DE MICHAEL COM DIFERENTES CATALISADORES E DIFERENTES CONDIÇÕES	24
TABELA 3: CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS NPS.....	29
TABELA 4: CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL	33

1. Introdução

1.1 Guanidinas

Guanidinas são grupos funcionais com caracter básico, tendo um pka de 13.6 [1]. Em certas condições de pH este grupo funcional encontra-se protonado sendo bastante reativo, permitindo interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio com outros substratos (Figura 1.1) [2].

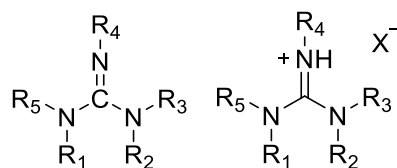


Figura 1.1: Estrutura geral da guanidina livre e protonada

Existem várias guanidinas presentes na natureza, como por exemplo a creatina, sintetizada no fígado, é uma fonte de energia para o ser humano [3]. Análogos da creatina podem ser usados para tratamento de doenças mitocondriais (Figura 1.2) [4]. Recentemente a empresa L'oreal descobriu guanidinas que podem substituir sais de alumínio para o tratamento contra a transpiração (Figura 1.3) [5].

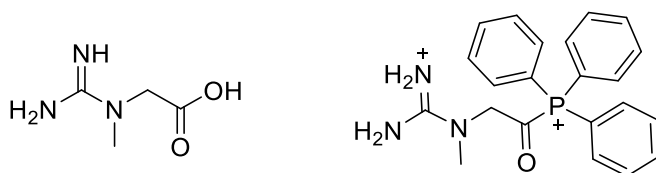


Figura 1.2: Creatina e seu análogo

São vários os compostos possuindo o grupo guanidina e que apresentam atividade biológica o que torna o desenvolvimento e estudo de novos compostos guanidínicos bastante importante para a medicina e indústria farmacêutica [6]–[8].

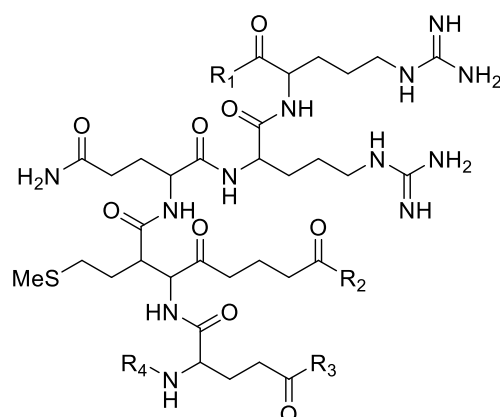


Figura 1.3: Guanidina com propriedades antitranspirantes

O núcleo de guanidina já foi bastante estudado e um dos autores foi Yu et al, este verificou a sua atividade catalítica em reações de adição de Michael [9]. Sendo este o artigo base para este trabalho.

1.2 Catálise Assimétrica

Sabatier definiu catálise como o mecanismo onde um composto gera ou acelera reações químicas sem fazer parte dos produtos da reação [10].

Catálise assimétrica é um dos procedimentos à disposição dos químicos no qual um catalisador quiral permite a formação de um composto quiral de tal modo em que é favorecida a formação de um estereoisômero preferencialmente. A função do catalisador é favorecer um estereoisômero mediante as aproximações e interações entre o catalisador quiral e os reagentes, favorecendo um determinado estado de transição em relação a outro [11].

Catálise química divide-se em três classes: catálise heterogénica, catálise homogénica e catálise enzimática. Esta classificação está relacionada com o estado físico do catalisador e se este é miscível (catálise homogénea) ou não com os reagentes (catálise heterogénea). Quando é utilizado uma proteína trata-se de uma catálise enzimática (Figura 1.4).

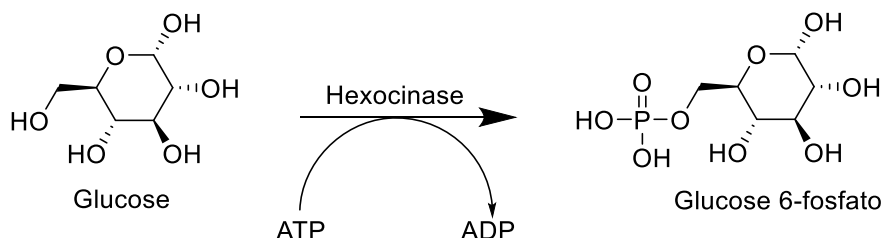


Figura 1.4: Exemplo de uma catálise enzimática

Existem diferenças entre a catálise homogénea e catálise heterogénea, sendo que esta segunda está mais associada à catálise com imobilização do catalisador num suporte (Figura 1.5). Existem vantagens e desvantagens para ambas as catálises. A catálise homogénea está associada a uma maior atividade catalítica, em relação a catálise heterogénea, pois o catalisador está em solução com os reagentes facilitando o processo. Contudo o facto de estes estarem em solução irá dificultar o processo de separação do catalisador. Esta desvantagem vai contra a política da química verde, política que preza pela menor utilização de reagentes e neste caso pela reciclagem de catalisador.

A catálise heterogénea consegue oferecer as vantagens como uma separação simplificada, recuperação do catalisador e uma possível reutilização [12].

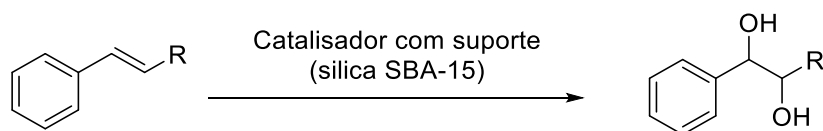


Figura 1.5: Exemplo de uma catálise heterogénea

Catálise assimétrica é bastante importante para a química orgânica e a indústria farmacêutica. É comum o interesse em apenas um de dois enantiómeros,

a possibilidade de separação destes dois com um excesso considerável é bastante interessante. Neste trabalho um dos objetivos é estudar um catalisador numa reação assimétrica e a obtenção de um produto maioritário, neste caso num produto com dois centros quirais e por conseguinte formam-se diastereoisómeros numa reação diastereosseletiva. Devido a isto iremos analisar dois parâmetros relacionados com os estereoisómeros formados, o excesso diastereomérico e o excesso enantiomérico (Figura 1.6).

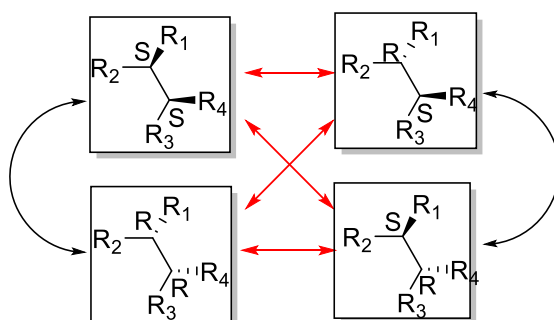


Figura 1.6: Esquema da relação entre possíveis estereoisómeros (setas a vermelho indicam diastereómeros e a preto indicam os vários enantiómeros formados).

Para a análise desta relação de possíveis produtos formados numa reação diastereosseletiva pode ser utilizada a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (para o excesso diastereomérico) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (para o excesso enantiomérico). Este último, será determinado com recurso a uma coluna quiral de fase normal, HPLC de fase normal consiste na separação de compostos de acordo com a afinidade através de interações, como por exemplo pontes de hidrogénio. De acordo com a estrutura um enantiómero ficará retido na coluna mais tempo que outro. A fase móvel é apolar, ou seja, compostos mais polares ficam retidos na coluna fazendo com que o tempo de retenção seja maior do que compostos menos polares. Com o aumento da polaridade do eluente, menor vão ser os tempos de retenção.

1.3 Nanopartículas magnéticas e sua aplicação em catálise

A utilização de nanopartículas metálicas magnéticas acopladas a pequenas moléculas orgânicas, na Figura 1.7 podemos observar uma nanopartícula ligado a grupos funcionais (FG) que terão atividade catalítica, o acoplamento acontece com a ligação do grupo de ancoragem (AG) á NP. Diferente de outros suportes sólidos estes são suportes com dimensões na ordem da nano escala, sendo assim, apresentam vantagens de acessibilidade e estabilidade levando a uma maior capacidade de atividade catalítica [13].

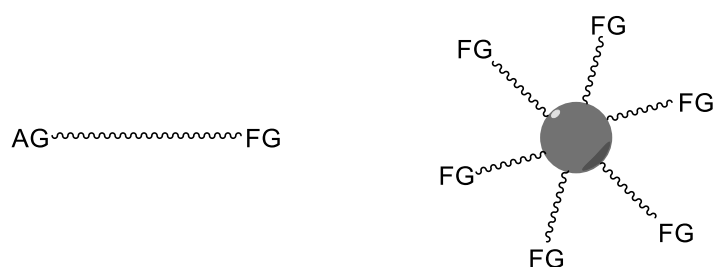


Figura 1.7: Representação esquemática de uma molécula ancorada a uma NP

Este tipo de acoplamento tem sido estudado e desenvolvido nos últimos anos devido à reutilização sustentável de catalisadores orgânicos. É uma área de estudo relativamente recente e dada a relevância é essencial estudar a viabilidade deste tipo de catalisadores [14].

Neste trabalho vai ser utilizado o óxido de ferro (Fe_3O_4), mas existem várias outras nanopartículas já estudadas como suporte para várias funcionalidades (Figura 1.8). São exemplo nanopartículas de Al_2O_3 e TiO_2 [15], [16].

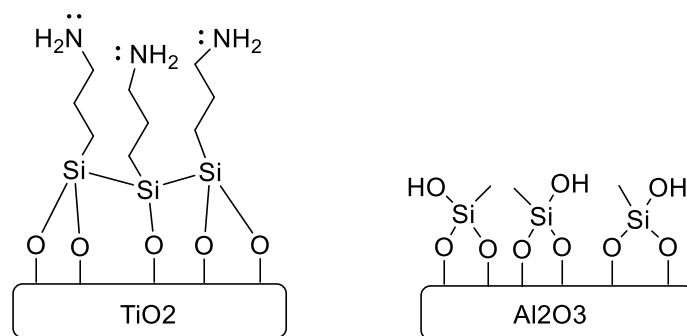


Figura 1.8: NPs de titânio e alumínio acopladas a pequenas moléculas orgânicas

Estes exemplos, podem ser úteis para o uma melhor funcionalização das nanopartículas por pequenas moléculas orgânicas. Porém estes não são magnéticos. Esta vantagem é mais explorada em nanopartículas de óxido de ferro (ou ferrite), com isso, Fe_3O_4 foi a escolha para este trabalho.

1.4 Adição de Michael

A reação de adição de Michael consiste na adição de um nucleófilo (ou doador de Michael) a um composto carbonilo α,β -insaturado (aceitador de Michael) adição essa que ocorre na dupla ligação e por vezes é também designada por adição conjugada 1,4 [17].

A adição consiste em três passos, ativação do nucleófilo (por formação do enolato), adição conjugada e protonação (Figura 1.9).

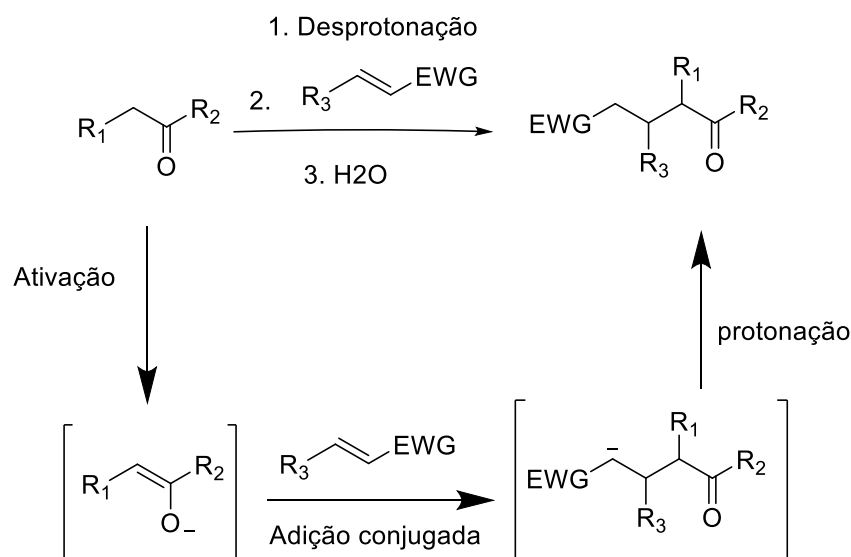


Figura 1.9: Esquema da reação padrão de adição de Michael

O produto de reação de adição de Michael pode conter um ou mais centros quirais; um dos centros pode já estar presentes nos reagentes de partida, pode surgir com a nova ligação carbono-carbono. O que significa que esta reação tem a possibilidade de formação de vários estereoisômeros e que em ambiente controlado o resultado pode favorecer a formação preferencial de um dos estereoisômeros. O catalisador é parte essencial para influenciar o produto final e isto vai depender da natureza, mecanismo e da aproximação dos centros proquirais dos reagentes [18].

O catalisador utilizado pode ser um metal ou um composto orgânico. Neste trabalho o catalisador estudado é um organocatalisador num suporte metálico, mas como o suporte não tem interferência permitindo apenas uma recuperação rápida do catalisador pode-se considerar que se encontra somente na segunda categoria.

2. Discussão de resultados

2.1 Preâmbulo

O objetivo deste trabalho é estudar a utilização de nanopartículas magnéticas como suporte de aminoguanidinas quirais a utilizar como catalisador em reações de adição de Michael. O catalisador (1) a desenvolver encontra-se na figura 2.1, este já foi estudado onde foram obtidos bons resultados. Devido a propriedade magnética das nanopartículas vai-se estudar também a reutilização do catalisador e a viabilidade deste ao longo destas reutilizações.

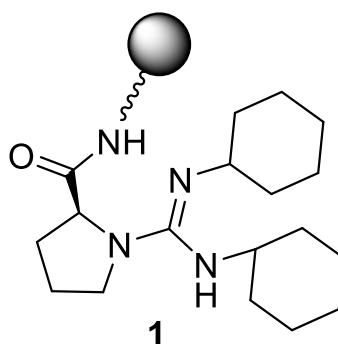


Figura 2.1: Catalisador a desenvolver envolvendo a funcionalização de Fe_3O_4 com um derivado da prolina

2.2 Funcionalização das nanopartículas magnéticas

Para o acoplamento/revestimento da Fe_3O_4 foi utilizado (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) possuindo um grupo funcional amina apropriada para reações de acoplamento. Este tipo de composto permite envolver como uma camada esférica a nanopartícula e assim evitar a aglomeração destas partículas. [17]

Foram feitas várias funcionalizações variando as condições experimentais tais como o solvente, temperatura, tipo de agitação e até o recipiente onde se dava a reação. Uma das dificuldades destas reações é o facto de as mesmas não poderem ser seguidas por RMN devido ao facto de Fe_3O_4 ser paramagnético. Posto isto, o resultado das reações foi controlado de três maneiras, por espectroscopia de infravermelhos (IV), pelo teste colorimétrico para deteção de amins livres e pela massa de produto obtida (dada as dificuldades acrescidas devido ao magnetismo e perda de produto este último processo nem sempre se mostrou vantajoso). No caso do teste de amins livres, este tinha como base a mudança de cor de ninidrina em contacto com amins livres, passando de amarelo para roxo (teste descrito no procedimento geral secção 3.4) [19].

Num primeiro ensaio (Tabela 1, entrada 1) foram utilizados um balão e um agitador magnético, mas no fim da reação existiam várias perdas de óxido de ferro, pois este fica preso ao agitador, logo esta opção foi descartada.

Tendo isto em conta, foi analisado, paralelamente, outros métodos para a funcionalização.

Tabela 1: Condições de funcionalização das nanopartículas

Entrada	Reagentes	Solvente	Condições		Funcionalização	Ref.
1	APTES	Tolueno	Refluxo	Balão/ Agitador	Não	[20]
2	APTES	Neat	Temp. ambiente	Eppendorf	Sim	-
3	APTES	Etanol/ água	60°C	Balão/ Ultrasom	Não	[21]
4	APTES	Etanol/ água	Temp. ambiente	Balão/ Ag. mecanico	Não	[21]
5	APTES/ água	Glicerol	Temp. ambiente	Balão/ Ag. mecanico	Sim	[19], [22]

A primeira hipótese foi a utilização de um *ependorff* ou *schlenk* onde as nanopartículas iriam ficar mais agregadas e a agitação iria ser feita pelas próprias nanopartículas (Tabela 1, entrada 2). Estas reações foram feitas sem solvente e não poderiam ser feitas em refluxo como era previsto no primeiro artigo de referência. Apesar das condicionantes, o produto mostrou ter no IV bandas concorrentes com a funcionalização da nanopartícula nomeadamente as bandas a 2119 cm^{-1} , identificativas da presença de amins (Figura 2.3) comparado com o IV da NP antes da funcionalização (Figura 2.2), onde podemos ver as bandas correspondentes a H_2O (3437 e 1638 cm^{-1}) e da ligação Fe-O correspondente as bandas 632 e 589 cm^{-1} . É possível observar a 1449 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} bandas correspondentes as vibrações das ligações RO-Si-CH₂R, RSi-CH₂R e RH₂C-NH₂, respetivamente. Um outro procedimento utilizado para verificar a presença de amins envolveu a realização do teste colorimétrico para identificar amins livres que deu resultado positivo.

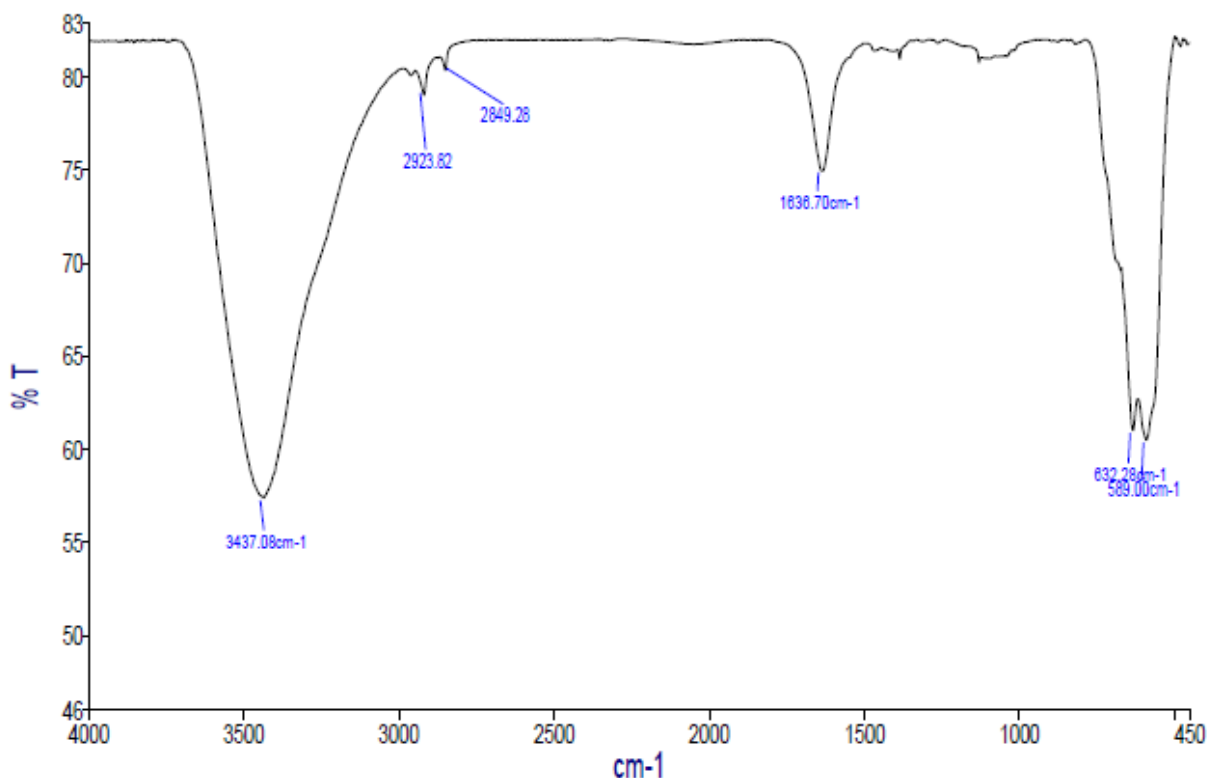


Figura 2.2: Espectro IV do nanopartícula Fe_3O_4

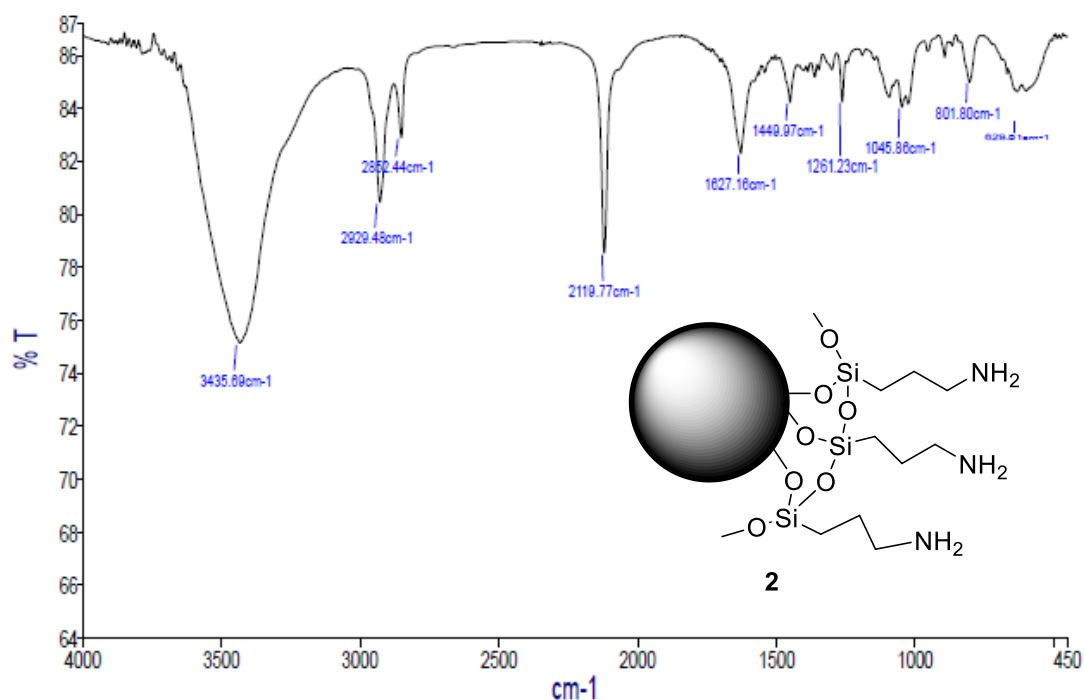


Figura 2.3: Espectro IV do produto 2

Outra hipótese foi a alteração do modo de agitação nomeadamente a utilização de ultrassons. Foi seguido o protocolo descrito na literatura [19] onde não existia a necessidade de refluxo e utilizava a mistura etanol/água como solvente. Um problema encontrado foi a temperatura, onde, nestas condições se verificou que aumentava até a temperatura até atingir os 60 °C (Tabela 1, entrada 3).

Com esta condicionante, esta opção foi descartada, pois o aumento da temperatura fazia com que o etanol evaporasse ao longo do tempo, não se tendo obtido o resultado desejado. O teste de aminas livres deu negativo.

Já com um agitador mecânico, foi testada a combinação anterior (solvente etanol/água, sem ultrassons) em condições de temperatura controlada (Tabela 1, entrada 4). A água tinha como objetivo hidrolisar o APTES, com isto a funcionalização é mais facilitada e rápida. Porém os resultados não foram os esperados. No teste de ninidrina foi obtido resultado negativo.

Por fim, e paralelamente, foi testada outra alternativa onde se procedia à hidrólise do APTES, antes da sua adição as nanopartículas, isto com uma solução 10% de APTES em água.

Primeiro passo consistiu na hidrólise do APTES ao (3-aminopropil)silanetriol (APST), onde os grupos alcóxissilanos foram convertidos a grupos álcool numa reação S_N2 (Figura 2.4.).

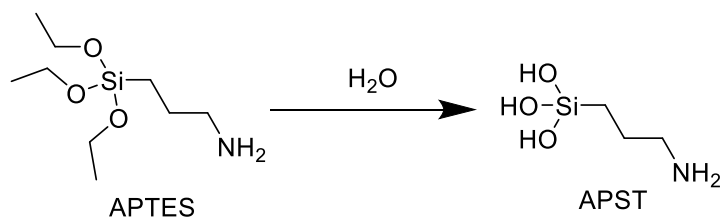


Figura 2.4: Esquema da hidrólise do APTES a APST

O segundo passo foi o acoplamento entre o Fe_3O_4 e os grupos reativos do silanol APST com a formação de **2**. Este foi feito em temperatura ambiente e tendo glicerol como solvente (Tabela 1, entrada 5). Foi verificado por IV a presença da banda a 2119 cm^{-1} (anexo 2) que correspondiam a uma função amina [23], [24]. Foi feito o teste de amins livres com o produto das reações e que apresentando resultado positivo, poder-se-ia afirmar que o APTES se encontrava acoplado às nanopartículas. O produto da reação nestas condições foi o produto com melhores resultados de funcionalização tendo em conta o IV e a massa do produto, sendo a única com aumento significativo em relação ao Fe_3O_4 inicial.

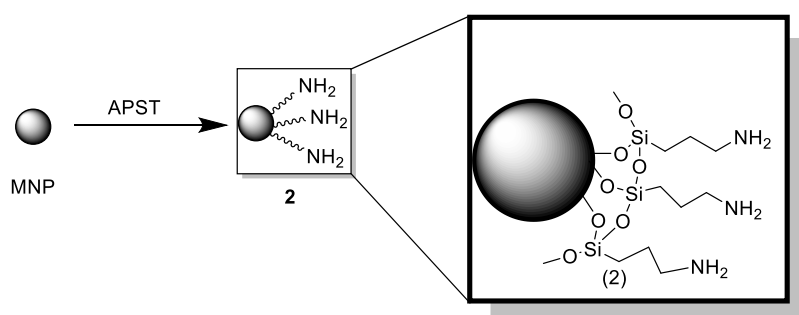


Figura 2.5: Esquema da funcionalização

2.3 Inserção da Fmoc-Prolina

Para a construção do catalisador (1) foi escolhido a L-prolina protegida, para uma posterior desproteção e adição de uma carbodiimida, neste caso a Fmoc-Prolina (Fmoc-Pro). O primeiro passo consistiu na ativação da Fmoc-Pro, esta ativação passa pela dupla de reagentes EDC/NHS, que permite a formação de um bom grupo de saída para o acoplamento à Fe_3O_4 funcionalizada tal como descrita anteriormente com APTES (Figura 2.6). Este passo da reação foi acompanhado por TLC onde é possível verificar bastante bem a formação de novo produto a cada passo reacional.

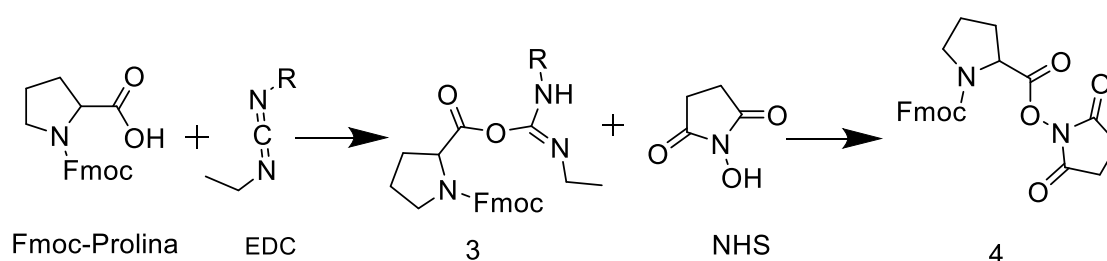


Figura 2.6: Esquema da ativação da Fmoc-Prolina

O primeiro passo envolve a reação da Fmoc-Pro com EDC (Figura 2.7), onde é possível verificar o desaparecimento de Prolina em solução através de TLC.

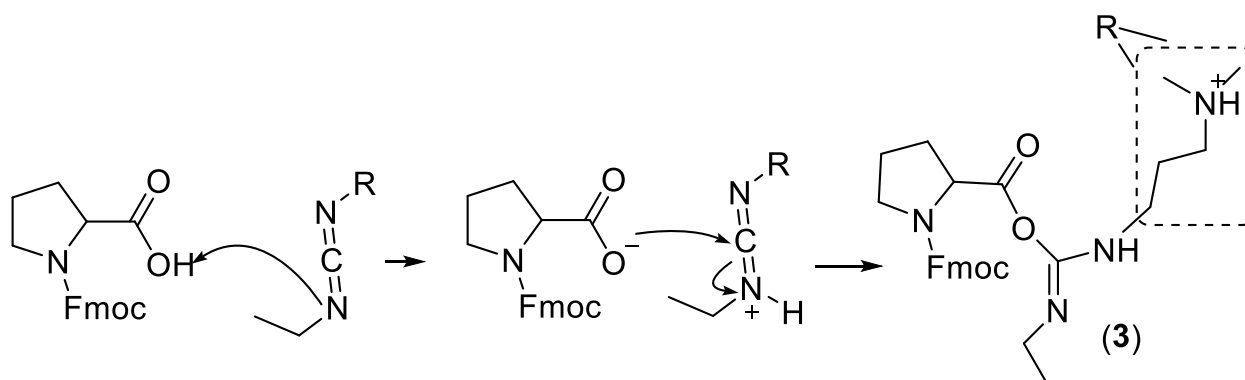


Figura 2.7: Mecanismo da formação do produto 3

Depois é adicionado NHS, este que passa a consistir num bom grupo de saída quando ligado ao grupo ácido carboxilo do aminoácido (Figura 2.8). Por TLC é possível verificar após a adição de NHS o aparecimento de um novo produto (4) e ao longo do tempo o desaparecimento de 3.

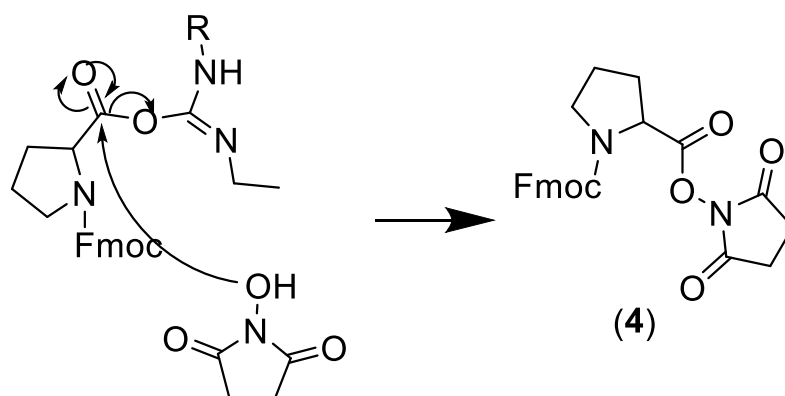


Figura 2.8: Mecanismo para a formação de 4

Por fim, é adicionado (2) ocorrendo uma reação de substituição para obtenção do produto final (5) (Figura 2.9).

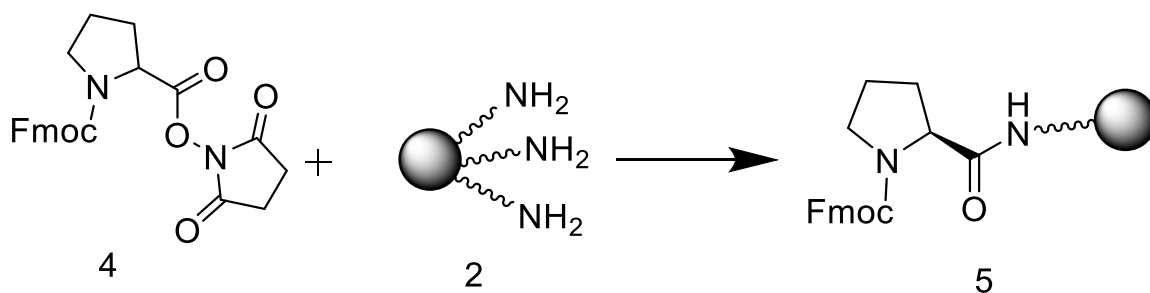


Figura 2.9: Esquema da reação de adição da Fmoc-Prolina á nanopartícula

Foi realizado novamente o teste de amins livres e a análise por IV. Desta vez, e de acordo com o esperado, o teste com ninidrina deu resultado negativo permanecendo com a cor amarela. No caso do IV, desaparece a banda a 2119 cm^{-1} e surge a banda correspondente ao grupo carbonilo a 1630 cm^{-1} (Anexo 3). O produto obtido já não tem amins primarias e sim uma amida secundaria.

2.4 Reação de desproteção da Prolina derivatizada

Antes da adição da carbodiimida foi necessário realizar a desproteção do grupo amina da prolina (**5**). Para a clivagem foi utilizado uma base, no caso piperidina numa solução 5% de piperidina em diclorometano. O mecanismo da reação de remoção do grupo Fmoc aparece na figura 2.10, onde por TLC foi possível verificar o produto de remoção (9-metileno-floureno), para além disto por IV retorna a banda a 2122 cm^{-1} correspondente à amina. O teste colorimétrico foi negativo, pois passamos a ter uma amina secundária, e o teste identifica apenas aminas primárias.

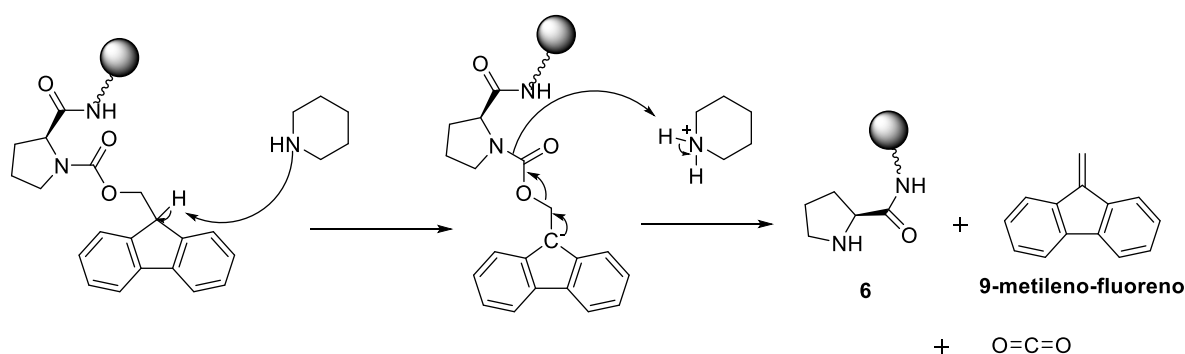


Figura 2.10: Mecanismo de desproteção de **5**

2.5 Introdução do grupo carbodiimida

A introdução do grupo carbodiimida é um dos passos mais importantes da via sintética, a formação da guanidina. Este passo consiste na adição de uma carbodiimida, mais precisamente a diciclohexilcarbodiimida (DCC) à amina recém desprotegida [25]. O mecanismo encontra-se na figura 2.11. Com a adição da carbodiimida à amina desprotegida vamos formar a guanidina desejada.

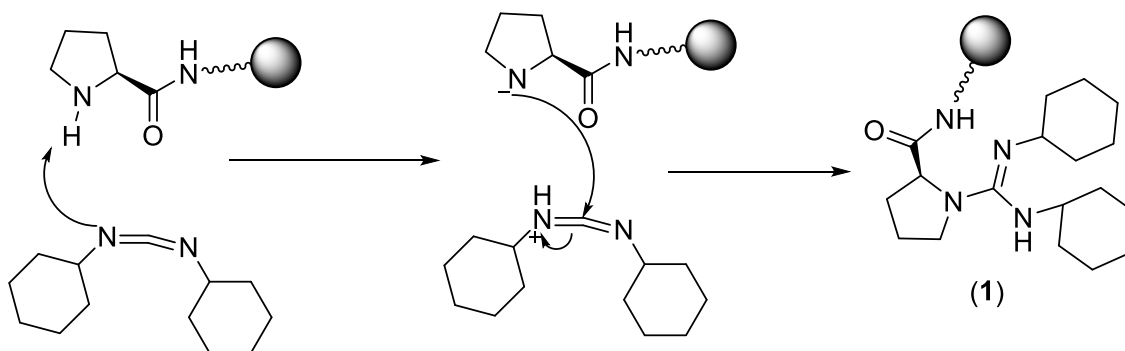


Figura 2.11: Mecanismo de adição de DCC ao produto 6

Foi possível verificar o desaparecimento da banda de IV a 2122 cm^{-1} verificada no produto 6.

2.6 Via alternativa à síntese do catalisador

Em alternativa foi feito o mesmo processo para a derivatização da L-Prolina mas o passo de acoplamento à Fe_3O_4 passou a ser o último passo da síntese. Nesta via é possível acompanhar as reações de derivatização da L-Prolina por RMN assim como verificar o rendimento das reações.

Procedeu-se no primeiro passo à ativação da Fmoc-Prolina com a dupla de reagentes EDC/NHS e posterior reação com APTES (Figura 2.4). Foi analisado por TLC o produto da ativação (4), e foi obtido resultados semelhantes aos de ativação de aminoácido mas com o acoplamento à NP, onde é possível verificar o aparecimento de produto e desaparecimento de reagentes ao longo do tempo.

Depois da ativação é adicionado APTES. Num primeiro ensaio este último passo decorreu durante 24h, e ao fim desse tempo foi verificado por TLC que existiu a formação de produtos indesejados, tendo sido feita uma coluna de separação para isolar estes produtos e identificá-los por RMN. Para além do produto desejado (produto 7) foram isolados mais dois compostos. O primeiro correspondia ao APTES derivatizado (8) e o segundo correspondia a 9-metileno-floureno (9), produto de remoção do Fmoc, figura 2.12.

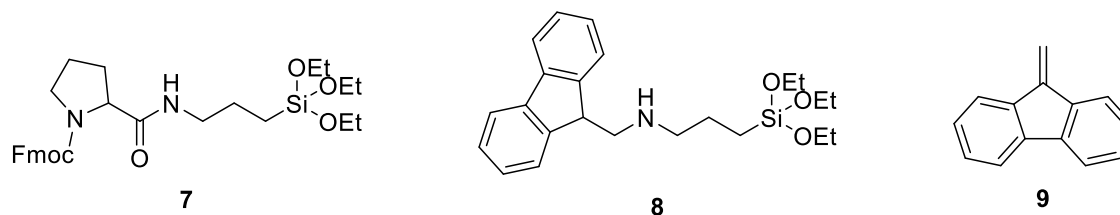


Figura 2.12: Produtos da reação adição da Fmoc-Prolina ao APTES

O APTES adicionado sendo um composto básico promovia a remoção do grupo Fmoc da Prolina, o que provocava uma diminuição do rendimento da reação no composto pretendido (7). Para se perceber qual destes processos se dava primeiro, foi feito este mesmo processo, mas acompanhado ao minuto por TLC. Foi verificado que 15 minutos era limite onde temos apenas o produto desejado.

Em seguida foi realizada a desproteção de 7, esta nas mesmas condições da desproteção utilizando uma solução de 5% de piperidina em diclorometano. Depois foi feita uma coluna de purificação. Apesar de isolarmos o produto este era em pequena quantidade. Este passo foi repetido várias vezes e sempre com resultado semelhante, o rendimento não passava dos 6%.

2.7 Adição de Michael entre nitro-estireno (10) e 2-oxociclopentano-1-carboxilato de etilo (11)

O nanocatalisador magnético (1) anteriormente preparado foi utilizado como catalisador na reação de adição de Michael entre o nitro-estireno (10) e o 2-oxociclopentano-1-carboxilato de etilo (11) (Fig 2.13). Nesta reação vão ser formados dois centros assimétricos e por consequência diastereómeros. Com o objetivo de obter um produto com dois centros assimétricos foi necessário a utilização de um reagente já com um centro assimétrico, neste caso presente no oxociclopentano.

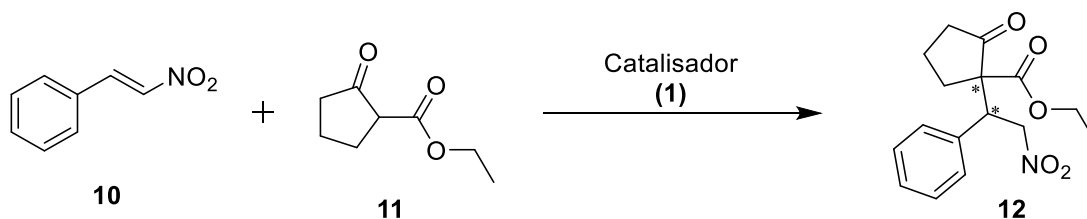


Figura 2.13: Esquema da reação padrão de adição de Michael

As condições de reação variaram, onde a agitação e a temperatura foram os fatores estudados. Foi também efetuada esta reação de adição de Michael com catálise orgânica por bases comerciais. Com os catalisadores magnéticos sintetizados foram exploradas três opções: sem agitador, sonificação e agitador mecânico. As reações com agitador mecânico e com auxílio de sonificação foram as que tiveram melhores resultados. As reações sem agitador não possibilitaram a reutilização de catalisador.

Em relação a temperatura também foram analisadas três opções: baixa temperatura, temperatura ambiente e ultrassom. No caso do ultrassom a reação é colocada a temperatura ambiente, porém ao longo do tempo a temperatura vai aumentando atingindo 60 °C. Todas as condições de temperatura tiveram resultados positivos.

A combinação com resultados mais constantes foram a baixa temperatura com agitador mecânico.

Foram estudados 4 catalisadores, para além do sintetizado (1) os restantes 3 foram bases comerciais para a obtenção de um padrão racémico.

As bases comerciais são DBU, DBN e trietilamina. Foram obtidos apenas resultados com DBU e trietilamina, e por sua vez foram os resultados obtidos nestes ensaios que constituíram o padrão racémico para comparação em HPLC.

Devido a impossibilidade de verificar quantas das nanopartículas estão realmente funcionalizadas, não foi possível realizar a reação com uma determinada percentagem de catalisador em relação aos reagentes de partida.

2.7.1 Mecanismo

A utilização de catalisadores com aminas como grupos funcionais advém da sua capacidade de estabelecerem pontes de hidrogénio, um dos mecanismos para a indução da quiralidade formada.

O catalisador forma um estado de transição estável onde favorece a formação da nova ligação e com isto formando um produto maioritário, tornando a reação enantiosseletiva. Este estado de transição foi proposto por Yu et al [9] (Figura 2.14).

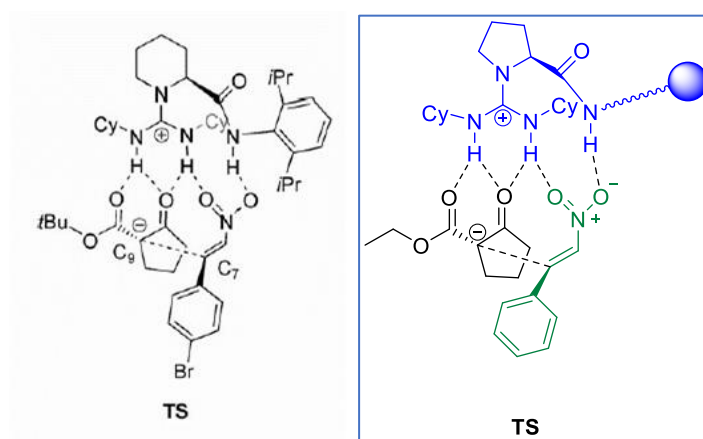


Figura 2.14: Possível estado de transição, o primeiro proposto por Yu et al, o segundo proposto para este trabalho

2.7.2 Recuperação e reutilização de catalisador (1)

Um dos objetivos era estudar a recuperação e reutilização do catalisador com a utilização das nanopartículas magnéticas.

Até a terceira repetição é possível observar que os resultados são bastantes semelhantes, não havendo grandes perdas de atividade (Tabela 2, entrada 13, 14 e 15). As reações realizadas no ultrassom foram feitas 6 repetições e é possível verificar que o rendimento diminui de 87% para 39%, uma diferença bastante significativa (Tabela 2, entrada 10 e 12).

Podemos afirmar que existe reprodutibilidade, e apesar da diminuição do rendimento estes não afetaram a indução do catalisador.

2.7.3 Resultados analíticos

A análise do produto e o seu excesso diastereomérico foi feito por ^1H -RMN.

Para analisar a presença de produto é necessário perceber a nova ligação e o que resulta desta. A formação da ligação foi entre o carbono 5 de **11** e carbono 10 do nitroestireno (**10**), Fig 2.14. Com isto deixou de haver ligação dupla entre o carbono 9 e 10. O carbono 5 perdeu um hidrogénio e o 9 agora tem 2 H.

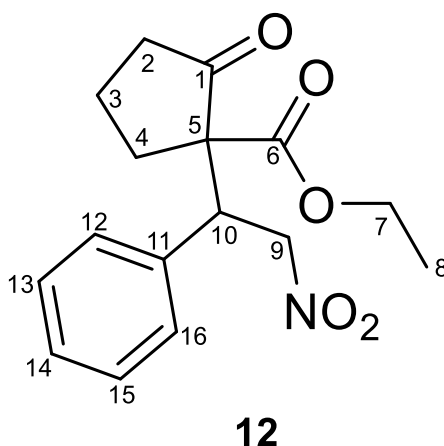


Figura 2.15: Produto da reação de adição de Michael (**12**)

Foi possível identificar o composto **12** (Figura 2.15), onde os sinais entre 2.10-1.85 ppm e entre 2.45-2.30 ppm são multipletos que integram para quatro e dois protões, respetivamente, protões que correspondem aos hidrogénios do anel do ciclopentano. O sinal correspondente aos três protões do metilo terminal aparece como um tripleto a 1.29 ppm, para finalizar o grupo etilo podemos ver o quarteto a 4.23 ppm integrando para dois protões. O anel aromático aparece, com uma integração de 5H, como um multipeto entre 7.35-7.25 ppm. Adjacente ao anel aromático encontra-se um sinal que surge como um dupeto de dupletos a

4.10 ppm que corresponde ao próton 10 (Figura 2.15). Por fim adjacente ao grupo nitro aparecem quatro sinais, um por cada próton, ou seja, dois sinais para cada diastereómero. A 5.19 ppm ($J = 14$ e 4 Hz) e a 5.04 ppm ($J = 13$ e 11 Hz) os dupletos de duplete do diastereómero *anti* e a 5.31 ppm ($J = 13$ e 11 Hz) e a 4.86 ppm ($J = 14$ e 3 Hz) os correspondentes ao diastereómero *syn* (Figura 2.16 e 2.17).

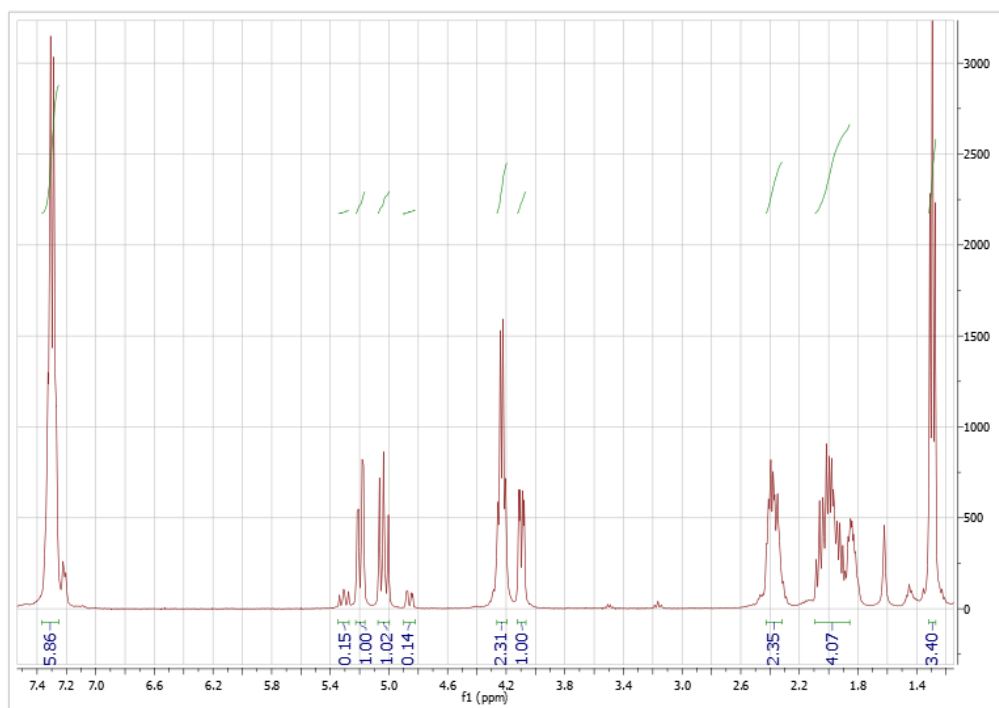


Figura 2.16: Espetro de RMN do produto 12

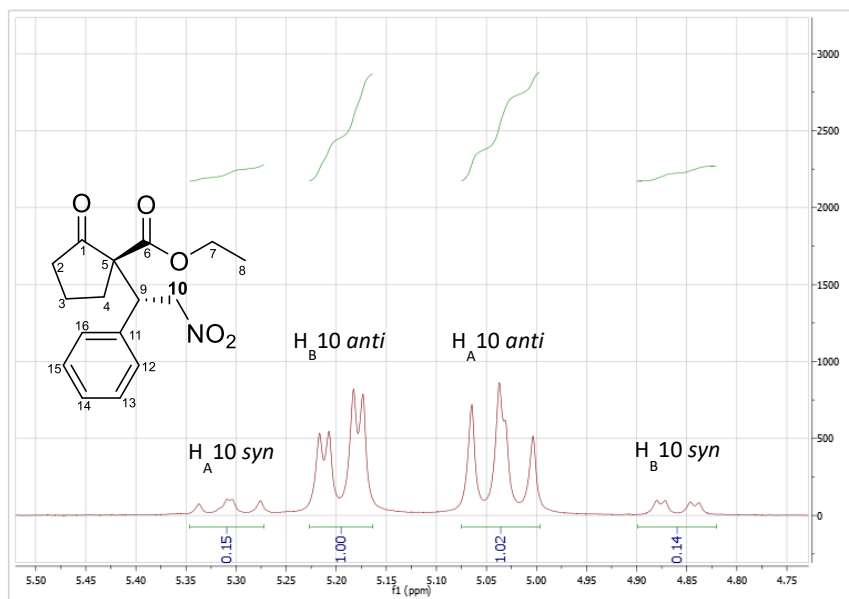


Figura 2.17: Espetro de NMR do produto 12 (5.5ppm a 4.75ppm)

O objetivo da análise por HPLC usando uma coluna de fase quiral (Chiralpak IB) era identificar se existia enantioselectividade, ou seja, verificar se no par de diastereoisômeros maioritário existia algum tipo de excesso enantiomérico. Foram verificados o excesso de ambos os pares diastereoisoméricos.

É observável em todos os cromatogramas um primeiro pico (tempo de retenção 10.9 min) que corresponde ao oxopentano (**11**), que apesar das purificações por coluna de cromatografia, não foi possível removê-lo na totalidade já que apresentava um R_f praticamente idêntico ao produto.

Como é possível observar na tabela 2 (entrada 10) e na figura 2.18 o excesso enantiomérico (ee) com o catalisador (**1**) é bastante pequeno (3.2%), existindo praticamente 50/50 de cada enantiômero do par maioritário (*anti*).

Para além disto os valores do excesso enantiomérico para o par *syn* não são constantes mesmo para uma mesma repetição nas mesmas condições.

Os valores baixos, mas constantes, do par *anti* indicam que não existiu indução e o catalisador não é capaz de induzir a formação de um enantiômero seletivamente. Porém os valores aleatórios do par *syn* apontam para uma possível

contaminação de amostra com algum composto que apresente um tempo de retenção semelhante a um dos estereoisômeros.

Estes resultados merecem uma melhor atenção no futuro.

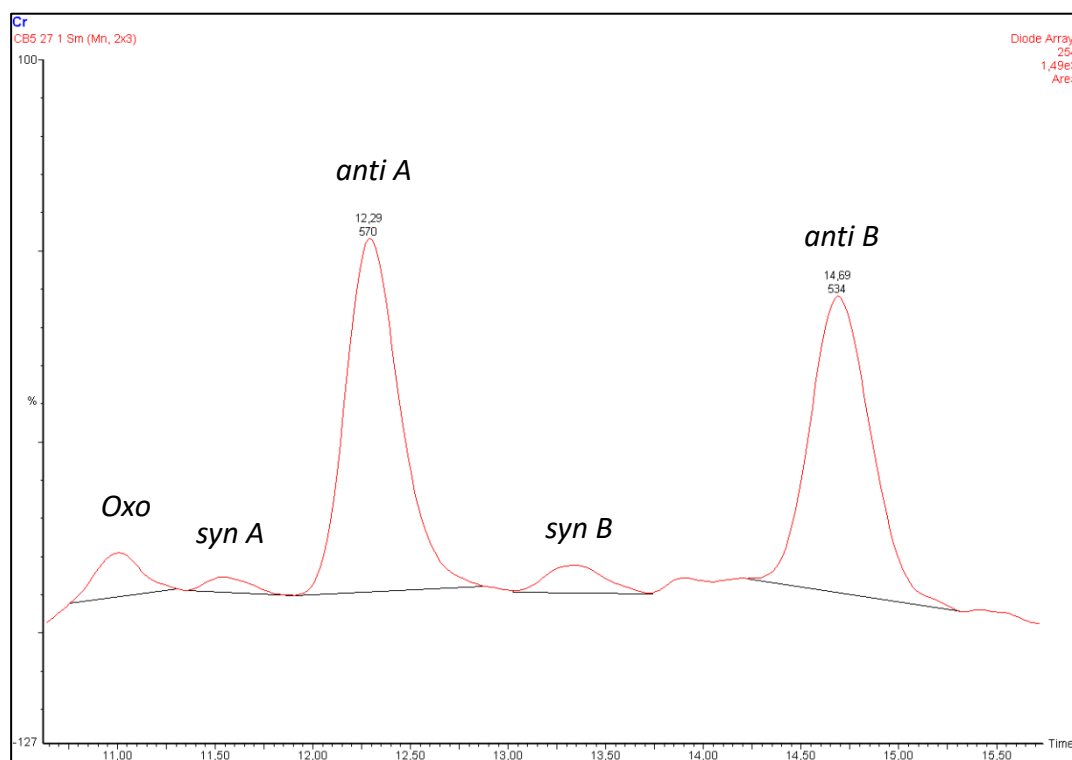
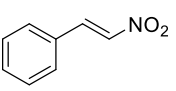
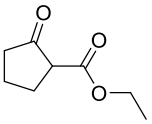


Figura 2.18: HPLC quiral do produto 12

Tabela 2: Resultado da adição de Michael com diferentes catalisadores e diferentes condições

	Catalisador	Rep.*			Excesso enantiomérico (%) ^{a)}		Excesso diastereomérico (%) ^{b)}	Rendimento (%) ^{c)}
					<i>Syn</i>	<i>Anti</i>		
1	-	-	1eq	1eq	-	-	-	Não ocorre reação
2	DBU	-	1eq	1eq	-	-	-	Não ocorre reação
3	DBN	-	1eq	1eq	-	-	-	Não ocorre reação

4	DBU	-	1eq	2eq	-		10%	Crude
5	DBU	-	1eq	1.5eq	3.5%	22.1	1%	Crude
6	Trietilamina	-	1eq	1.5eq	-		47%	78%
7	Fe3O4	-	1eq	1eq	-		-	Não ocorre reação
8	1	1x	1eq	1eq	-		62%	Crude
9	1	2x	1eq	1eq	-		-	Não ocorre reação
10	1	1x	1eq	1.5eq	42.7%	3.2%	62%	87%
11	1	3x	1eq	1.5eq	19.6%	2.7%	74%	52%
12	1	6x	1eq	1.5eq	32.4%	2.4%	58%	39%
13	1	1x	1eq	1.5eq	68.8%	3.8%	76%	49%
14	1	2x	1eq	1.5eq	38.2%	1.3%	66%	52%
15	1	3x	1eq	1.5eq	1.7%	2.5%	76%	34%
16	1	1x	1eq	1.5eq	27.7%	1.0%	76%	43%
17	1	2x	1eq	1.5eq	90.3%	0.4%	76%	66%
18	1	3x	1eq	1.5eq	0.5%	0.5%	68%	46%
19	1	1x	1eq	1.5eq	37.3%	2.1%	83%	Crude
20	1	2x	1eq	1.5eq	36.6%	2.2%	83%	Crude

*-Repetição

a) -Obtido através de HPLC b) - Obtido através de 1H-NMR

c) - Purificação feita com coluna de separação (Hexano- Éter 7:3 como eluente)

3. Parte experimental

3.1 Preâmbulo

Para a realização do trabalho experimental foi necessário o recurso a procedimentos gerais de laboratório bem como a equipamentos especializados descritos abaixo:

As reações foram seguidas por cromatografia de camada fina de placa de sílica Kieselgel GF 254 de 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio, a sua revelação foi feita através da radiação ultravioleta (UV) a 254 nm e/ou 366 nm e também através de reveladores, como por exemplo o reagente de ninidrina e ácido fosfomolibdico.

Quando necessário os compostos foram purificados através de colunas de sílica gel flash (Kieselgel 60 (Merck) de 230 – 400 mesh.

Os solventes e reagentes usados foram de marca Sigma-Aldrich e Scharlau. Para a realização de algumas reações foi necessário a secagem dos solventes efetuadas de acordo com a literatura. A medição do pH foi feita utilizando o papel indicar universal (Merck).

Para a caracterização dos compostos obtidos usou-se a Espectroscopia de infravermelho (IV). Os espectros foram adquiridos num espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum Two. Como suporte para as amostras sólidas o suporte utilizou-se pastilhas de brometo de potássio (KBr). Para a descrição dos espectros são apenas indicadas as frequências mais intensas, ou as mais características, que se apresentam segundo a frequência do máximo da banda de absorção (max em cm^{-1}) e da atribuição do grupo funcional correspondente.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram adquiridos num espectrómetro Bruker (modelo ARX 400), tendo sido empregue para os espectros de próton (^1H) 400 MHz. Os solventes usados foram o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e água deuterada (D_2O). Os dados obtidos foram descritos pelo seguinte formato: solvente deuterado utilizado; desvio químico (δ em ppm); área relativa

do sinal (nH, n° de prótons); multiplicidade do sinal: s (singleto), d (duplete), t (triplete), m (multiplete); constante de acoplamento (J em Hz); atribuição na estrutura.

As cromatogramas de HPLC foram adquiridos através de um detetor Waters (modelo 996), um autosampler Waters (modelo 717) e um controlador Waters (modelo 600). Foi utilizada uma coluna quiral Chiralpak IB de fase normal. Foi descrito o tempo de retenção dos picos de maior importância.

3.2 Síntese de catalisador

3.2.1 Funcionalização das nanopartículas magnéticas

Dissolveu-se 500 mg de Fe_3O_4 em 2 ml de glicerol e adicionou-se 52.8 ml de uma solução aquosa 1:10 v/v de APTES. Levou-se ao ultrassom durante 10 minutos. Depois a reação ficou em agitação mecânica e a temperatura ambiente durante 24 horas. Com auxílio de um magneto foi decantado o sobrenadante. Fez-se lavagens com 3x20 ml de metanol. O produto foi evaporado a secura. Fez-se o teste de aminas livres com resultado positivo. Obteve-se o produto 2, com 543.3 mg de massa de um sólido castanho escuro magnético. **IV (KBr) ν_{max} (cm^{-1}):** 3435 (NH), 2929 (C-alif.), 2119 (NH+), 1627 (NH), 1449 (Si-C), 1261 (C-N), 1045 (Si-O-C), 801 (C-N).

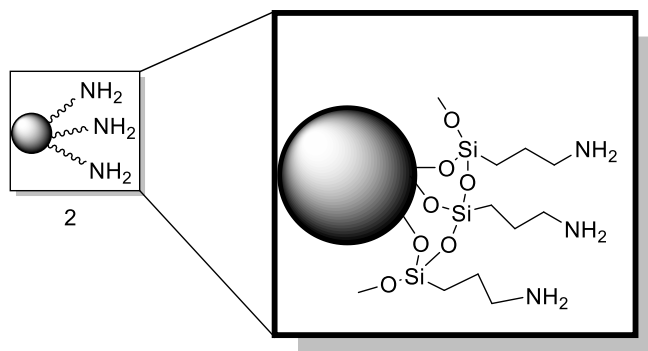


Tabela 3: Condições de reação de funcionalização das NPs

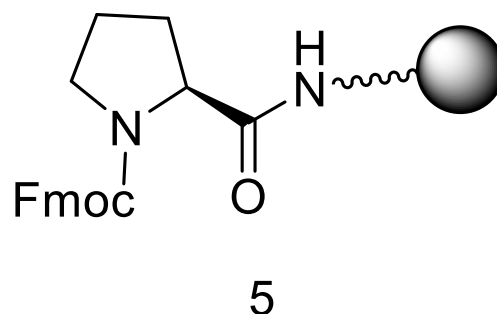
Entrada	Reagentes	Razão NPs/APTES*	Solvente	Temperatura	Condições	Tempo
1	APTES	0.33	Tolueno	Refluxo	Balão/Agitador	48h
2	APTES	0.66	Neat	Temp. ambiente	Eppendorf	72h
3	APTES	0.33	Etanol/ Água	60°C	Balão/ Ultrassom	24h
4	APTES	0.33	Etanol/ água	Temp. ambiente	Balão/ Ag. mecânico	24h
5	APTES/ Água	0.1	Glicerol	Temp. ambiente	Balão/ Ag. mecânico	24h

*- Razão da massa de Fe₃O₄, em gramas, pelo volume de APTES, em mililitros, adicionado.

3.2.2 Inserção da Fmoc-Prolina

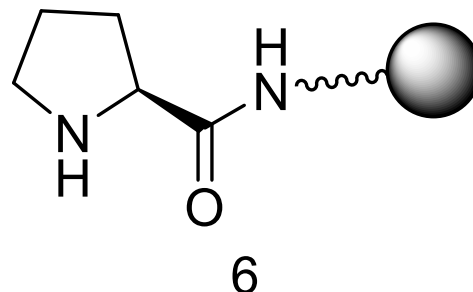
Adicionou-se 823.7 mg de EDC a uma solução de 1.63 g de Fmoc-Prolina em 24.4 ml de DCM seco. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente. Ao fim de 1 hora foi adicionado 617.0 mg de NHS a reação continuou nas condições anteriores durante mais 1 hora. Por fim adicionou-se a solução a um balão contendo

543.3 mg de (2), colocou-se em agitação mecânica e a temperatura ambiente durante 24 horas. Acompanhou-se a reação por TLC. Com auxílio de um magneto foi decantado o sobrenadante. Fez-se lavagens com 2x15ml de metanol. O produto foi evaporado a securo. Fez-se o teste de aminas livres com resultado negativo. Obteve-se o produto **5**, com 509.0 mg de massa de um sólido castanho escuro magnético. **IV (KBr) v_{max}. (cm⁻¹):** 3435 (NH), 2919 (C-alif.), 1630 (C=O amida), 1400 (Si-C), 1200 (CN), 1097 (Si-O-C) e 584 (NH amida).



3.2.3 Reação de desproteção da Prolina derivatizada

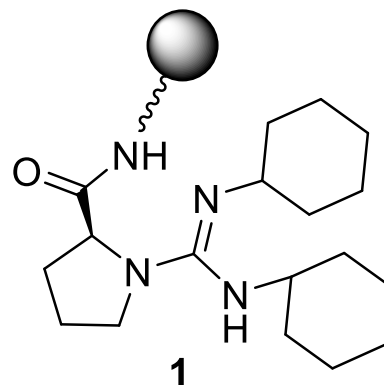
Ao composto **5** adicionou-se 23.6 ml de uma solução 5% ninidrina em diclorometano. Adicionou-se 2 ml de NaOH 1M até atingir o pH 9. A reação ficou em agitação mecânica a temperatura ambiente. Ao fim de 24 horas parou-se a reação e decantou-se o sobrenadante com auxílio de um magneto. Fez-se lavagens com 2x10 ml de metanol.



O produto foi evaporado a secura. Fez-se o teste de aminas livres com resultado negativo. Obteve-se o produto **6**, com 502.4 mg de massa de um sólido castanho escuro magnético. **IV (KBr) ν_{max} (cm⁻¹):** 3435 (NH), 2919 (C-alif.), 2122 (NH⁺), 1627 (C=O amida), 1400 (Si-C), 1200 (CN), 1100 (Si-O-C) e 589 (NH amida).

3.2.4 Introdução do grupo carbodiimida

Dissolveu-se 1.50 g de DCC em 15 ml de metanol, adicionou-se 502.4 mg de **6** e 15 ml de água. Adicionou-se NaOH 1M gota-a-gota até pH=9. A reação ficou a agitação mecânica a 60°C durante 18 horas. Ao fim deste tempo, e com auxílio de um magneto o sobrenadante foi decantado. Fez-se lavagens com 3x15 ml de metanol. O produto foi evaporado a secura. Fez-se o teste de aminas livres com resultado negativo. Ob-

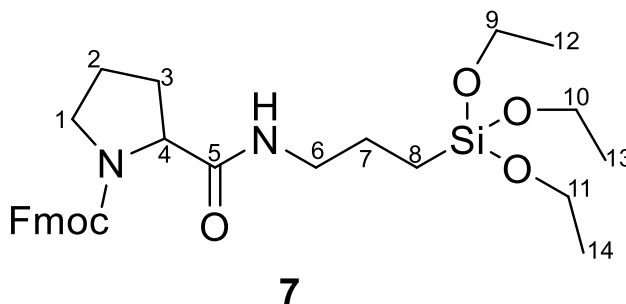


teve-se o produto **1**, com 471.8 mg de massa de um sólido castanho escuro e magnético. **IV (KBr) ν_{max} (cm⁻¹):** 3435 (NH), 2923 (C-alif.), 1629 (C=O amida), 1400 (Si-C), 1200 (CN) 1096 (Si-O-C) e 586 (N-H amida).

3.3 Via alternativa à síntese do catalisador

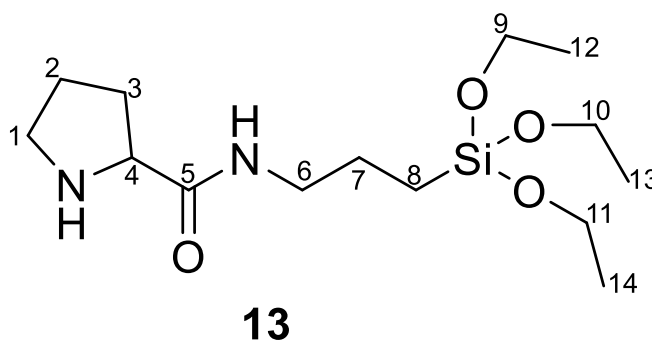
3.3.1 Inserção da Fmoc-Prolina

Adicionou-se 142.7 mg de EDC a uma solução de 249.3 mg de Fmoc-Prolina em 10 ml de DCM seco. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente. Ao fim de 1 hora e 30 minutos foi adicionado 85.7 mg de NHS a reação continuou nas condições anteriores durante mais 1 hora e 30 minutos. Por fim adicionou-se a solução a um balão contendo 0.17 ml de APTES, a reação ficou a temperatura ambiente durante 24 horas. Acompanhou-se a reação por TLC. O produto foi evaporado a securo. Foi feita uma coluna de separação, tendo como eluente 5% de metanol em diclorometano. Evaporou-se novamente. Fez-se o teste de amins livres com resultado negativo. Obteve-se **7**, com 509.0 mg de massa de um sólido branco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.82 – 7.31 (8H, m, H-fmoc), 4.48 – 4.21 (4H, m, H-fmoc, H4), 3.80 (6H, q, J = 6.4 Hz, H9-11), 3.53 (2H, s, H1), 3.25 (2H, s, H2), 1.93 (2H, s, H3), 1.77 (2H, s, H6), 1.61 (2H, s, H7), 1.21 (9H, t, J = 6.6 Hz, H12-14), 0.62 (2H, s, H8).



3.3.2 Reação de desproteção da Prolina

Ao composto **7** adicionou-se 23.6 ml de uma solução 5% ninidrina em diclorometano. Adicionou-se 2 ml de NaOH 1M. A reação ficou em agitação mecânica a temperatura ambiente. Ao fim de 24 horas parou-se a reação e decantou-se o sobrenadante



com auxílio de um magneto. Fez-se lavagens com 2x10 ml de metanol. O produto foi evaporado a secura. Fez-se o teste de amins livres com resultado negativo. Obteve-se **13**, com 502.4mg de massa de um sólido castanho escuro magnético. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 4.22 – 4.06 (4H, m, H4), 3.80 (6H, q, J = 6.4 Hz, H9-11), 3.39-3.21 (4H, m, H1-2), 1.74-1.53 (6H, m, H3, 6-7), 1.25 (9H, t, J = 6.6 Hz, H12-14), 0.71-0.58 (2H, m, H8).

3.4 Teste de amins livres

Adicionou-se 2 mg do produto funcionalizado a 1 ml de água destilada. Adicionou-se 3 gotas de uma solução padrão citrato a pH=5 e 2mg de ninidrina. A solução ficou em aquecimento durante 30 minutos. Obtém-se resultado positivo se a solução apresentar cor roxa e negativo se a cor não se alterar [19].

3.5 Reação de adição de Michael

3.5.1 Reação de adição de Michael com catálise de DBU

Dissolveu-se 50.1 mg de nitro-estireno (**10**) em 1 ml de THF. Adicionou-se a esta solução 0.05 ml de DBU (0.1 eq.). Colocou-se a reação em agitação e adicionou-se 0.075 ml (1.5 eq.) de oxopentano (**11**). A reação ficou á temperatura ambiente durante 24h. Fez se RMN do crude. (Tabela 4, entrada 5). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 7.24 – 7.21 (m, 5H), 5.22 (dd, J = 13.0, 11.6 Hz, 1H), 5.13 (dd, J = 13.6, 3.6 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 13.3, 11.7 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 13.4, 3.2 Hz, 1H), 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.04 (dd, J = 10.9, 3.6 Hz, 1H), 2.36 – 2.28 (m, 2H), 1.99 – 1.87 (m, 4H), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

3.5.2 Reação de adição de Michael com auxílio o catalisador 1

Dissolveu-se 100.6 mg de nitro-estireno (**10**) em 5 ml de THF. Adicionou-se a esta solução 50.3 mg do catalisador **1**. Levou-se ao ultrassom até à dispersão total das MNPs. Colocou-se a reação em agitação mecânica e adicionou-se 0.15 ml de oxopentano (**11**). A reação ficou à temperatura ambiente durante 24h.

Após este tempo foi decantado o produto do catalisador. Fez-se coluna de separação (hexano-éter etílico 7:3 como eluente). Obteve-se um sólido branco. (Ta-

bela 4, entrada 13). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36 – 7.25 (5H, m, H11-16), 5.31 (1H, dd, *J* = 13.4, 11.2 Hz, H9), 5.19 (1H, dd, *J* = 13.6, 3.7 Hz, H9), 5.03 (dd, *J* = 13.4, 11.1 Hz, H9), 4.86 (dd, *J* = 13.5, 3.4 Hz, H9), 4.23 (2H, q, 7.1 Hz, H7), 4.10 (1H, dd, *J* = 10.9, 3.6 Hz, H10), 2.46 – 2.32 (2H, m, H2), 2.08 – 1.90 (4H, m, H3-4), 1.29 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H8). HPLC (hexano/2-propanol = 90/10, 1.0 mL/min, λ = 254 nm); tR (diastereoisômero maioritário) = 12.3 min e 14.7 min; tR (diastereoisômero minoritário) = 11.6 min e 13.6 min.

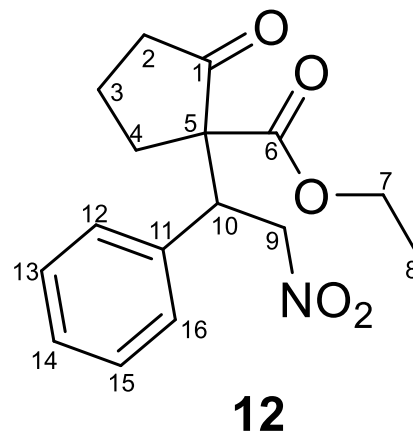
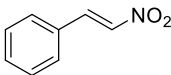
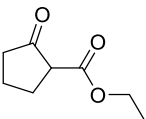


Tabela 4: Condições de reação de adição de Michael

	Catalisador	Rep.*			Catalisador %	Temperatura	Agitação	Tempo
1	-	-	1eq	1eq	-	RT	Agitador Magnético	24h
2	DBU	-	1eq	1eq	0.1eq	-4.5°C	Agitador Magnético	26h
3	DBN	-	1eq	1eq	0.1eq	-2.8°C	Agitador Magnético	26h
4	DBU	-	1eq	2eq	0.1eq	-6.1°C	Agitador Magnético	24h

5	DBU	-	1eq	1.5eq	0.1eq	RT	Agitador Magnético	24h
6	Trietilamina	-	1.5eq	1eq	0.1eq	RT	Agitador Magnético	16h
7	Fe ₃ O ₄	-	1eq	1eq	1eq	-6°C	Sem agitador	22h
8	1	1x	1eq	1eq	1eq	-4.4°C	Sem agitador	26h
9	1	2x	1eq	1eq	1eq	-4.2°C	Sem agitador	24h
10	1	1x	1eq	1.5eq	1eq	61°C	Ultrassom	5h
11	1	3x	1eq	1.5eq	1eq	58°C	Ultrassom	5h
12	1	6x	1eq	1.5eq	1eq	60°C	Ultrassom	5h
13	1	1x	1eq	1.5eq	1eq	RT	Agitador Mecânico	24h
14	1	2x	1eq	1.5eq	1eq	RT	Agitador Mecânico	24h
15	1	3x	1eq	1.5eq	1eq	RT	Agitador Mecânico	24h
16	1	1x	1eq	1.5eq	0.5eq	RT	Agitador Mecânico	24h
17	1	2x	1eq	1.5eq	0.5eq	RT	Agitador Mecânico	24h
18	1	3x	1eq	1.5eq	0.5eq	RT	Agitador Mecânico	24h
19	1	1x	1eq	1.5eq	1eq	-16°C	Agitador Mecânico	21h
20	1	2x	1eq	1.5eq	1eq	-14°C	Agitador Mecânico	20h

4. Conclusões

Com o objetivo de criar um catalisador acoplado a nanopartículas magnéticas o primeiro desafio foi a funcionalização destas partículas. Existiram várias dificuldades envolvidas neste passo, sendo que o manuseamento das nanopartículas foi a maior delas. Foram criadas as mais diversas alternativas á utilização de agitadores magnéticos, mas a que se destacou foi a utilização de um agitador mecânico. Este método e a pré hidrolise do APTES mostraram-se bastantes eficazes, como mostrou o teste colorimétrico e os espectros de IV para verificar o sucesso da reação.

A magnetização das NPs teve as suas vantagens. Os workups facilitados foram bastante úteis na separação de produto e na lavagem deste. Com isto evitou-se a utilização de eluentes para uma possível coluna de separação, contribuindo para uma química mais verde.

O processo de síntese da guanidina foi sempre acompanhado por IV e pelo teste de aminas livres, o que pode nos indicar se estamos num bom caminho ou não. Porém este procedimento apresenta limitações e não dá certezas. A via alternativa pode ser a melhor maneira de entender as reações. Esta via não conta com a presença de nanopartículas até ao passo final o que permite que se possa utilizar NMR para seguir a evolução das reações. Neste trabalho esta via foi eficaz para perceber os problemas existentes no passo de introdução da Fmoc-Prolina. Devido os maus resultados e baixos rendimentos esta via foi deixada de lado. No futuro seria importante estudar e otimizar esta via por recurso a outros grupos de proteção da L-prolina evitando assim a reação paralela de remoção do grupo Fmoc.

Com o catalisador **1** sintetizado, seguiu-se a sua utilização na reação de adição de Michael. Foram utilizadas várias condições. Á exceção da reação sem agitador, todas as condições testadas permitiram a reutilização do catalisador. Foram obtidos em todas as reações rendimentos bons para todas as condições. Este rendimento naturalmente diminuía ao longo das repetições. Por NMR foi verificado excesso diastereómero, este mostrou-se bastante elevado e apesar das

repetições manteve-se sempre constante. Com isto podemos afirmar existe reprodutibilidade, este que também era um dos objetivos para este catalisador.

Por fim foi utilizado HPLC para verificar a verdadeira indução e eficácia do catalisador. Com este método verificou-se o excesso enantiomérico. Para o par *syn* os excessos eram bastantes diferentes dentro de uma mesma linha de repetição e condições. Já para o par *anti* foi possível ver que o excesso é bastante baixo, mostrando que este catalisador é diastereosseletivo, mas não enantiosseletivo. Ou seja, favorece a formação de um par de produtos (*anti*) mas não majoritariamente um dos enantiómeros.

Para além do acompanhamento da síntese do catalisador, uma otimização da separação do produto da reação de adição de Michael é bastante importante para a análise em HPLC. Esta utilização de nanopartículas em catálise em química orgânica pode ainda ser desenvolvida, e neste caso, este pode ser o início para o estudo de outras aminoguanidinas com mais pontos de ancoragem, possibilitando uma melhor indução.

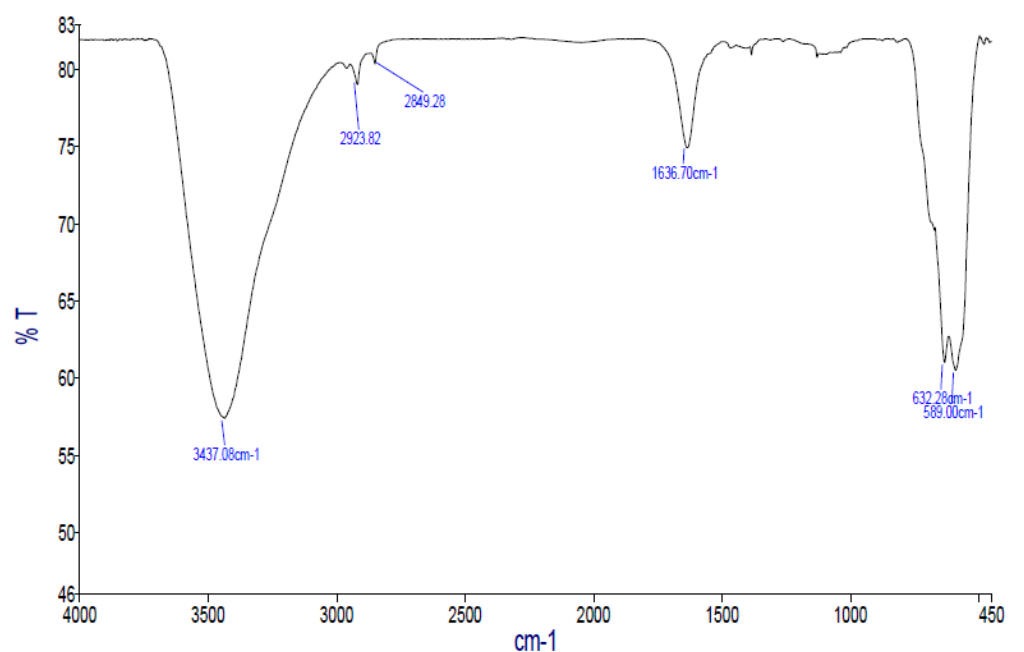
5. Bibliografia

- [1] F. Saczewski and Ł. Balewski, "Biological activities of guanidine compounds, 2008-2012 update," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 23, no. 8, pp. 965–995, 2013.
- [2] M. Göbel and T. M. Klapötke, "First structural characterization of guanidine, $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$," *Chem. Commun.*, vol. 13, no. 30, pp. 3180–3182, 2007.
- [3] P. Biochemistry and J. Foundation, "The Effects Energy of Guanidine and Alkylguanidines Transfer Reactions of Mitochondria *," vol. 238, no. 1, 1963.
- [4] Gencia Corp., "Mitochondrial compositions and uses thereof," 2009.
- [5] L'Oreal., "Use of novel amino acid derivatives as agents for treating human perspiration, and compositions containing them," 2011.
- [6] R. G. S. Berlinck and S. Romminger, "The chemistry and biology of guanidine natural products," vol. 33, no. 3, 2016.
- [7] S. Mo, A. Kronic, S. Pegan, S. Franzblau, and J. Orjala, "An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp.," *J Nat Prod*, vol. 72, no. 11, pp. 2043–2045, 2010.
- [8] Z. M *et al.*, "Synthesis of a new nitrogenated drimane derivative with antifungal activity," *Tetrahedron Lett.*, vol. 49, p. 4776, 2008.
- [9] Z. Yu, X. Liu, L. Zhou, L. Lin, and X. Feng, "Bifunctional guanidine via an amino amide skeleton for asymmetric michael reactions of β -ketoesters with nitroolefins: A concise synthesis of bicyclic β - Amino acids," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 28, pp. 5195–5198, 2009.
- [10] J. G. Knight, *Comprehensive Asymmetric Catalysis I-III*, vol. 343, no. 1. 2001.
- [11] P. Wyatt and S. G. Warren, *Organic synthesis : strategy and control*. 2007.
- [12] S. H. Kim and M. J. Jin, "Asymmetric dihydroxylation catalyzed by MCM-41 silica-supported bispinchona alkaloid," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 146, pp. 677–680, 2003.
- [13] C. W. Lim and I. S. Lee, "Magnetically recyclable nanocatalyst systems for the organic reactions," *Nano Today*, vol. 5, no. 5, pp. 412–434, 2010.
- [14] R. B. N. Baig and R. S. Varma, "Magnetically retrievable catalysts for organic synthesis," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 8, pp. 752–770, 2013.
- [15] L. D. Ellis, S. Pylypenko, S. R. Ayotte, D. K. Schwartz, and J. W. Medlin,

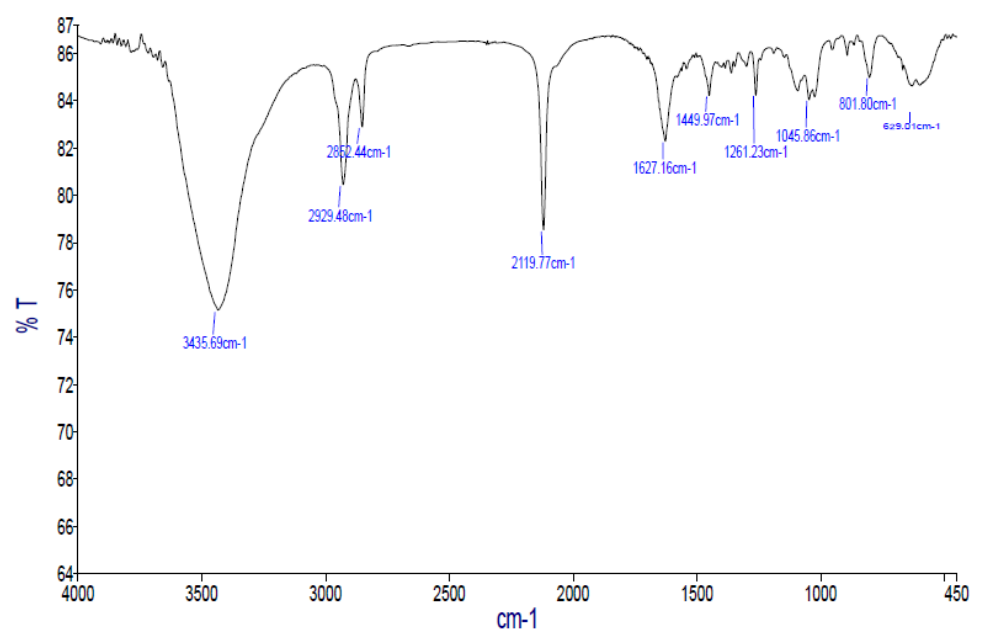
- "Trimethylsilyl functionalization of alumina (γ -Al₂O₃) increases activity for 1,2-propanediol dehydration," *Catal. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 14, pp. 5721–5728, 2016.
- [16] S. Bagheri, N. Muhd Julkapli, and S. Bee Abd Hamid, "Titanium dioxide as a catalyst support in heterogeneous catalysis," *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014.
- [17] E. L. Eliel, S. H. Wilen, D. A. Oare, and C. H. Heathcock, "Stereochemistry of the Base-Promoted Michael Addition Reaction," vol. 19, 1989.
- [18] E. Reyes, U. Uria, J. L. Vicario, and L. Carrillo, "The catalytic, enantioselective michael reaction," *Org. React.*, vol. 90, no. 1, pp. 1–898, 2016.
- [19] A. Scano, V. Cabras, F. Marongiu, D. Peddis, M. Pilloni, and G. Ennas, "New opportunities in the preparation of nanocomposites from biomedical applications: Revised mechanosynthesis of magnetite-silica nanocomposites," *Mater. Res. Express*, vol. 4, no. 2, 2017.
- [20] S. Sayyahi, S. Mozafari, and S. J. Saghanezhad, "Fe₃O₄ nanoparticle-bonded β -cyclodextrin as an efficient and magnetically retrievable catalyst for the preparation of β -azido alcohols and β -hydroxy thiocyanate," *Res. Chem. Intermed.*, vol. 42, no. 2, pp. 511–518, 2016.
- [21] B. Saif, C. Wang, D. Chuan, and S. Shuang, "Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Coated on APTES as Carriers for Morin-Anticancer Drug," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, pp. 267–275, 2015.
- [22] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura, and H. E. Toma, "Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 279, no. 2–3, pp. 210–217, 2004.
- [23] L. D. White and C. P. Tripp, "Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 232, no. 2, pp. 400–407, 2000.
- [24] T. James, *Infrared Spectroscopy*. Pan Stanford, 2018.
- [25] E. W. Thomas, E. E. Nishizawa, D. C. Zimmermann, and D. J. Williams, "Synthesis of Acylguanidine Analogues: Inhibitors of ADP-Induced Platelet Aggregation," *J. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 228–236, 1989.

6. Anexos

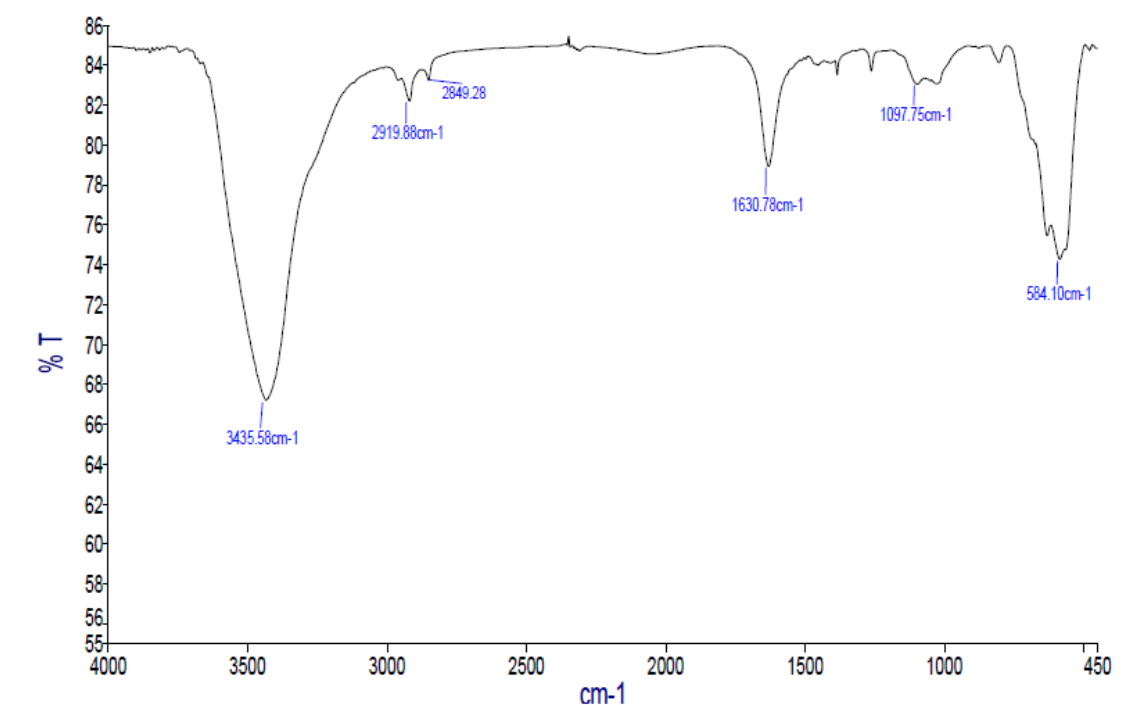
Anexo 1: Espetro Infravermelho das NPs de Fe_3O_4



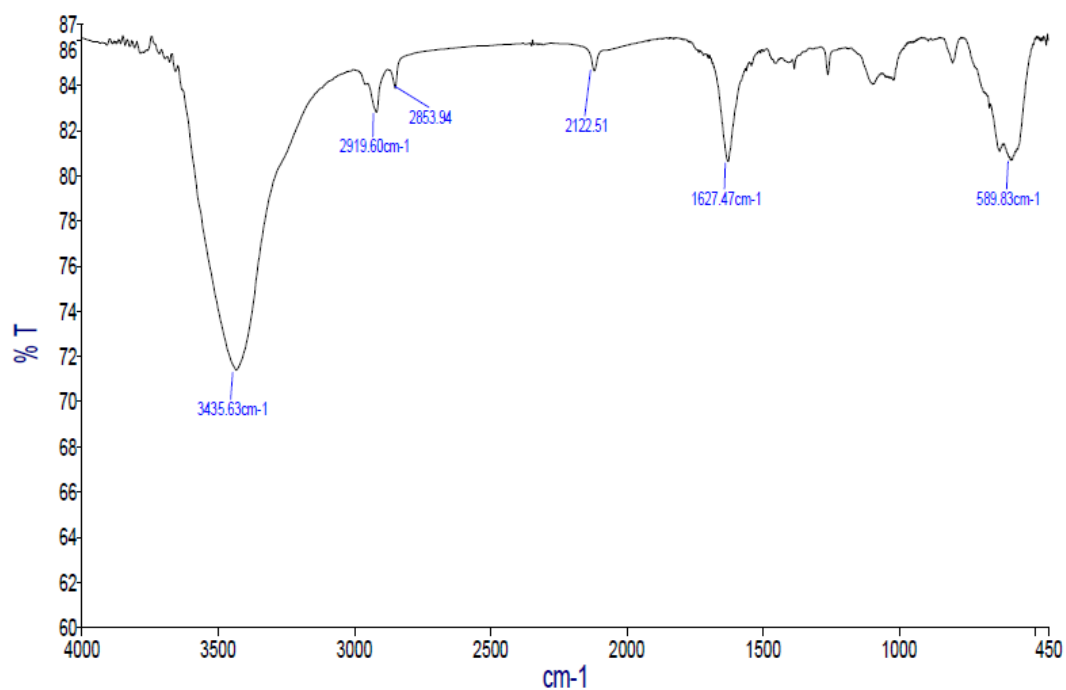
Anexo 2: Espetro de Infravermelho do produto 2



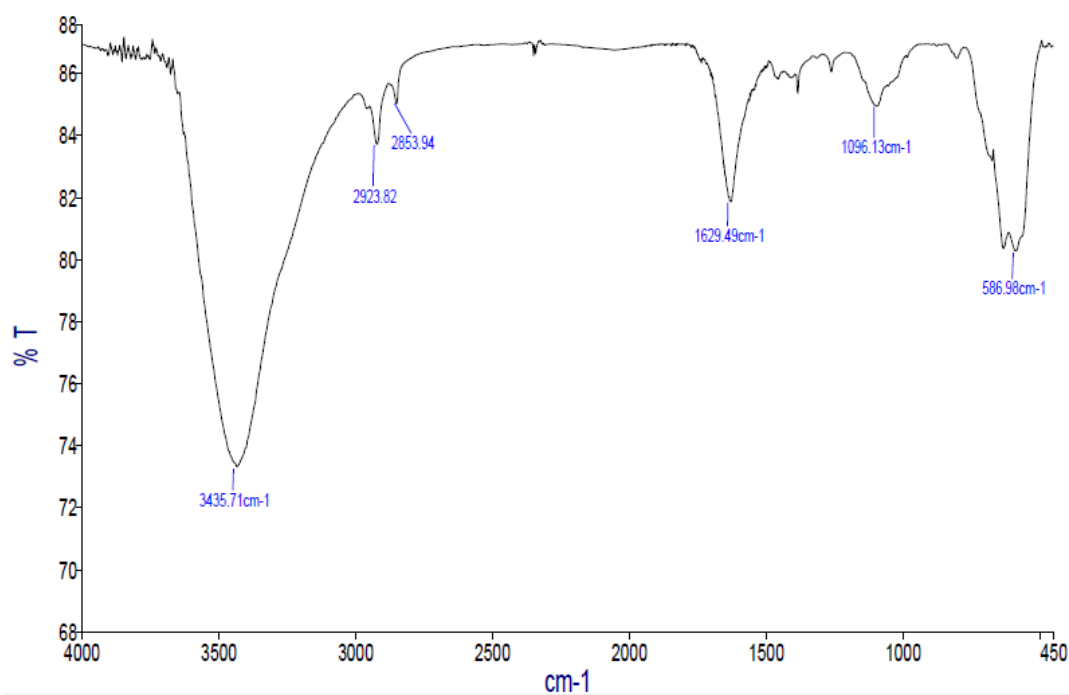
Anexo 3: Espectro Infravermelho do produto 5



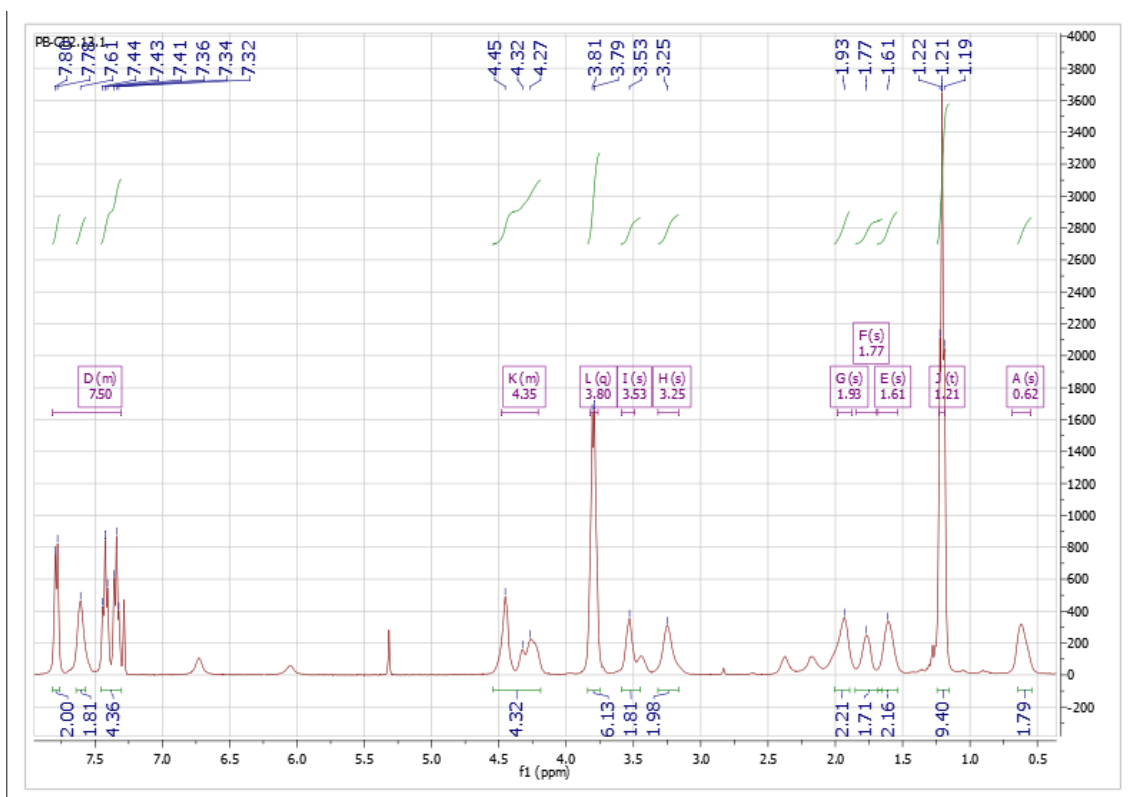
Anexo 4: Espectro Infravermelho do produto 6



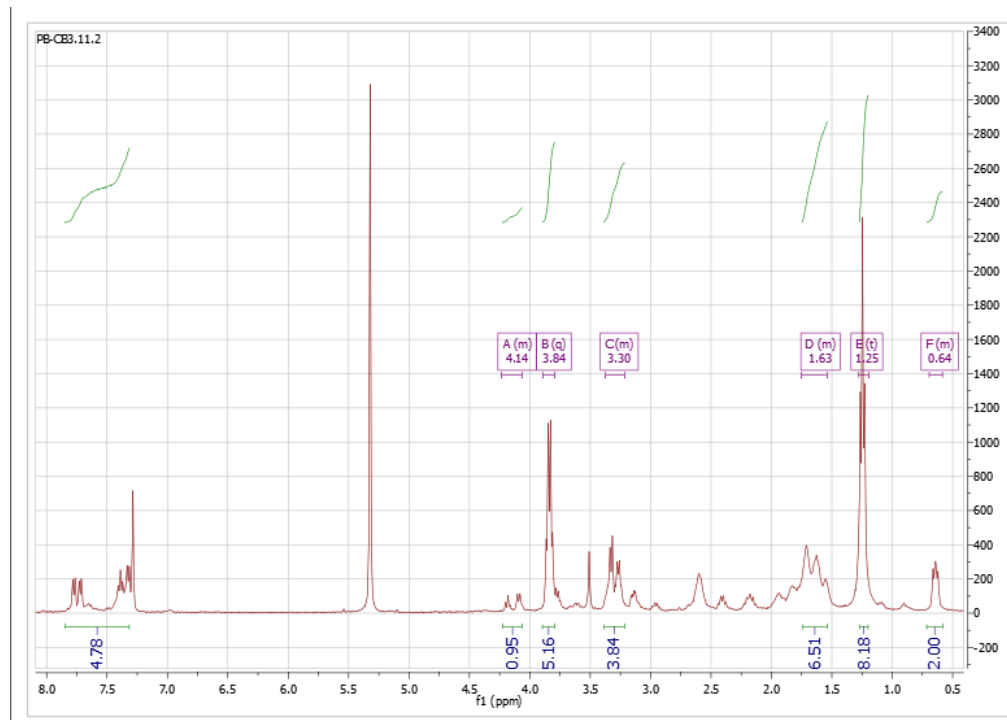
Anexo 5: Espectro Infravermelho do produto 1



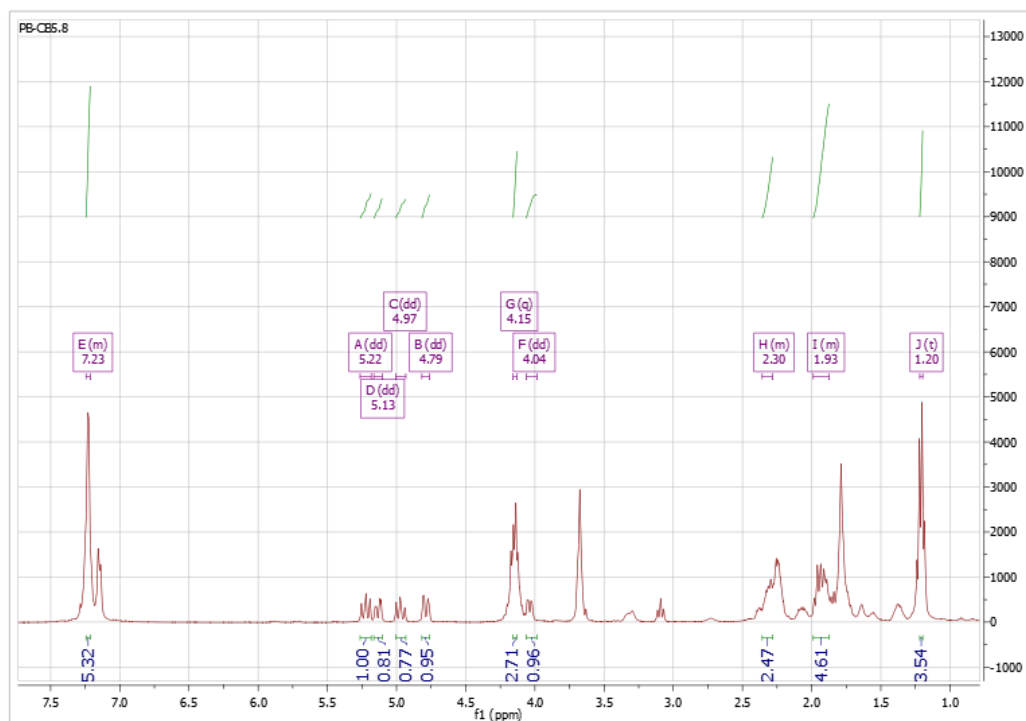
Anexo 6: 1H-NMR do Produto 7



Anexo 7: ¹H-NMR do produto 13



Anexo 8: ¹H-NMR do produto da reação de adição de Michael com a utilização de DBU



Anexo 9: 1H-NMR do produto 12

